

食品の微生物学的安全性確保のための技術開発

1. はじめに

2003年に制定された食品安全基本法で、「食品とは、すべての飲食物（薬事法に規定する医薬品および医薬部外品を除く）をいう。」とされている。食品の大部分は生き物とみなすことができる。生物に由来し、人にとって有害な成分を含む場合もあれば、病原体や有毒物質を媒介する場合もある。健全な食物も、微生物などの汚染を受け、放置すれば腐敗や変敗と呼ばれる変化を起し、食用不適となる。従って食料の生産から消費までのフードチェーン全般にわたる理解と衛生的な取扱いが必須である。

最近の腸管出血性大腸菌O157や黄色ブドウ球菌による大規模集団食中毒発生および牛海綿状脳症（BSE）問題等により、食品の安全性に対する国民の不安と関心がより一層高まっている。さらに表示の偽造等食品自身以外の要因にも影響を受けた不信感は、フードシステム全体に高まっている。食品取扱者には、専門知識・技能のみではなく、人間的にも信頼される人柄も求められている。

食品の安全性確保において、食中毒菌などの有害微生物の排除或いはそのリスク低減は極めて重要な課題である。そのためには生産から消費者に至る各段階での自主衛生管理の強化すなわち簡便で迅速かつ高精度な検査手法による微生物学的安全性の監視システムの充実が急務となっている。特に最近では、新鮮さ・機能性・利便性などの観点から、生鮮或いは非加熱の最小加工食品への消費者志向が強く、益々食品の微生物学的安全性確保が重要となってきている。さらには消費者自身による食するまでの家庭内での食品取り扱いに関する適切な衛生管理の実践がこれまで以上に必要とされる時代になりつつある。

本稿では、食品の微生物学的安全性確保のための迅速検出技術開発の必要性と意義および食品衛生対策チームで民間企業と共同で開発中の幾つかの技術について紹介する。

2. 最近の日本の食中毒動向

1996年の堺市を中心とした腸管出血性大腸菌O157による集団食中毒の発生は、世界中を震撼させた。それ以降の我が国の大規模食中毒事件でも病原大腸菌によるものが依然多発している。2002年には、老人保健施設で9名の死者を出すという悲惨なO157による集団食中毒事故が発生した（表1）。肉類のみならず、広範な食品がO157感染の媒体となっている。

表 1 1996年～2002年における病原性微生物による大規模食中毒発生状況

発生年	病原微生物	患者数	死者数	原因食品
1996	腸管出血性大腸菌O157	7,966	3	カイワレ大根
	サルモネラ属菌	1,833	0	ポパイサラダ
1997	病原大腸菌O169	2,750	0	弁当
	不明	3,044	0	弁当
1998	サルモネラ属菌	1,371	0	三色ケーキ
	腸管出血性大腸菌O157	49	0	イクラ
	ノロウィルス (SRSV)	1,196	0	弁当
	腸炎ビブリオ	1,167	0	弁当
	病原大腸菌O44	1,197	0	給食
1999	サルモネラ属菌	1,634	0	乾燥イカ菓子
	腸炎ビブリオ	509	0	煮カニ
2000	黄色ブドウ球菌	13,420	0	加工乳等
2001	腸管出血性大腸菌O157	195	0	牛タタキ等
	腸管出血性大腸菌O157	267	0	和風キムチ
2002	腸管出血性大腸菌O157	120	0	きゅうりの浅漬け
	腸管出血性大腸菌O157	139	9	給食

O157以外にもサルモネラ、黄色ブドウ球菌や腸炎ビブリオによる大規模食中毒が発生している。腸炎ビブリオ食中毒対策が2001年7月から改正され、功を奏しているが発生件数・患者数をみると依然油断ならない（表2）。厚生労働省の食中毒統計に1998年から加えられたノロウィルス（SRSV）によるものは、年々患者数が増えており、2003年の統計ではその数が1万人を超え、患者数で1位となっている。鶏卵・鶏肉を主な感染源とするサルモネラ食中毒発生は、最近4年間の発生件数で1位または2位の高いレベルで推移しており、防御対策を講じなければならない最重要食中毒菌の一つである。欧米で肉類（特に鶏肉）を感染源とするカンピロバクターによる食中毒が増えており、アメリカでは毎年500人以上が死亡していると推定されている。最近4年間の本菌食中毒発生件数は、幸いにも死者はいないがサルモネラとほぼ同じであり、欧米の5年遅れで日本でも流行する傾向があることから嚴重に注意する必要がある。

今までのところ、我が国においては発生事例が1例あるのみであるが、欧米先進諸国では、リステリア・モノサイトゲネスによる食中毒の発生に苦しんでおり、肉製品ばかりでなくカットフルーツやカットサラダ等の生食食品等も感染の媒体となっている。2002年夏以降、米国東部ではリステリア症が流行し、120名の患者と20名の死者が報告されている。原因食品の可能性があるととして、12,400トンにもおよぶ調理済み（Ready-To-Eat）食鳥肉がリコールされた。対岸の火事に留まっ

てほしいものであるが、本菌は冷蔵庫の中でも時間はかかるが増殖できることもあり、また我が国でも肉類（表3）や非加熱食品から欧米並の頻度で本菌が検出されていることから、今後厳重な警戒を要する。

表2 最近の食中毒発生状況

病原微生物	年次別発生件数				
	1996	2000	2001	2002	2003
サルモネラ属菌	350	518	361	465	350
黄色ブドウ球菌	44	87	92	72	59
ボツリヌス菌	1	0	0	1	0
腸炎ビブリオ	292	422	307	229	108
腸管出血性大腸菌O157		16	24	13	12
その他の病原大腸菌	179	203	199	83	35
ウェルシュ菌	27	32	22	37	34
セレウス菌	5	10	9	7	12
エルシニア・エンテロコリチカ	0	1	4	8	0
カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	65	469	428	447	490
ナグビブリオ	3	5	1	2	2
コレラ菌		1	1	2	0
ノロウイルス (SRSV)		245	269	268	278
総計	969	1,783	1,469	1,377	1,109

資料：厚生労働省「食中毒統計」

表3 我が国の食肉におけるリステリア・モノサイトゲネスの検出状況

食肉の種類		調査数	検出数	検出率 (%)
牛肉	枝肉	4,231	217	5.1
	薄切り肉	378	101	27
	ひき肉	49	11	22
	輸入枝肉	63	8	13
	豚肉	4421	355	8.0
豚肉	枝肉	397	128	32
	薄切り肉	104	20	19
	ひき肉	43	3	7
	内臓	59	2	3.4
	輸入枝肉	331	49	15
鶏肉	枝肉	350	140	40
	薄切り肉	53	22	42
	ひき肉	503	15	3.0
馬肉	薄切り			

資料：引用文献1

3. 食品の安全性と衛生管理

食品のリスク低減手法として、衛生管理を中心とする「HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point ; 危害分析と重要管理点)」や品質管理全般に適用される「ISO9000シリーズ」の導入が、原料生産者や食品加工工場内で進んでいる。前者は原則的には国が、後者はISO (国際標準化機構) がシステムを検証し認可する認証制度をとる。欧米では、HACCPの導入は食肉や水産物、加工食品には義務化される方向にある。我が国では、1996年の堺市での大腸菌O157集団食中毒事件の発生を契機に、加工食品製造や食肉処理にHACCPの導入が推奨・指導されるようになり、2002年には家畜飼料農家のガイドラインも作成された。

HACCPは、1960年頃、米国で宇宙食の安全性確保のために構築されたシステムであり、7原則・12手順よりなっている。HACCPは、従来の食品衛生規準による管理・指導では、食品の微生物学的安全性確保には殆ど無力であるとの認識のもとに生まれ、事業者自身による工場ごとの生産工程の安全・衛生管理が重要との考えに立っている。HACCPシステムの導入に伴い、最終製品の抜き取り検査に重点をおいた従来の衛生管理方式は様変わりし、食品工場の衛生体系は大きな見直しを迫られている。すなわち、危害分析 (HA) で設定した各工程の重要管理点 (CCP) をモニタリングして記録を残すことにより、最終製品のすべて (100%) の安全性を保証することが求められる (図1)。現在、食品での食中毒等のリスク低減のためには、「農場から食卓まで (From Farm To Table)」の連続した衛生管理が必要との国際的な認識である。すなわち「適正農業規範 (GAP: Good Agricultural Practice)」で良い原材料を生産し、適正製造規範 (GMP: Good

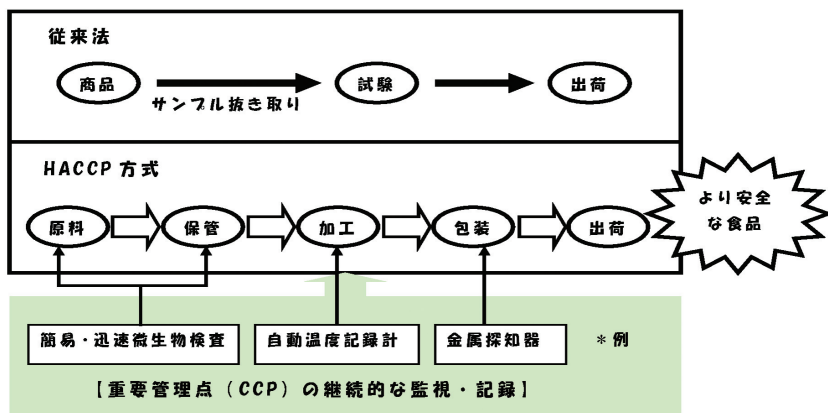


図1 HACCP方式と従来の衛生管理手法の違い

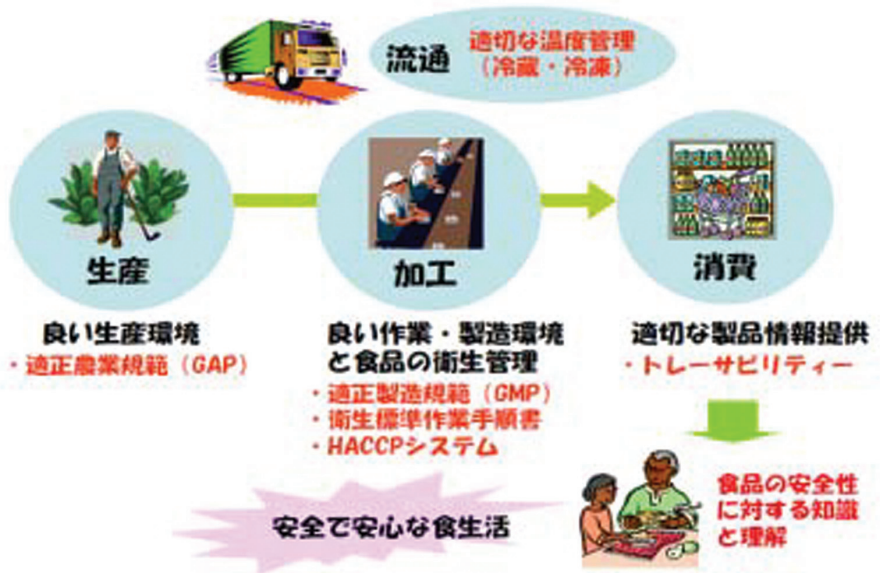


図2 農場から食卓までの連続した食品衛生管理システムの概念

Manufactural Practice)」で良い食品の製造・加工環境を確保して、食品としての衛生管理をHACCPで行おうとする連続したリスク低減の考え方である(図2)。

4. 微生物検査迅速化の必要性

微生物検査の手法は大きく後ろ向き検査と前向き検査の二つに分けられる。前者は食品衛生法に記載された公定法や「食品衛生検査指針」に記載されている従来法で、食中毒発生後の原因究明のための検査法としてもともと古くから定着している。公定機関の規格試験や衛生試験などはこれらに基づいて行われる。後者は、食品企業などが自主衛生管理のために行うもので、原料納入段階や生産工程で有害微生物のリスクが潜んでいないかといった食中毒予防すなわち安全性確保が目的となる。従ってできるだけ速やかに検査結果が生産工程にフィードバックできなくては意味がなく、簡易・迅速な検査手法が求められる。

HACCP導入で求められる微生物検査は当然「前向き検査」で、製造終了後何日間もかけて結果を得る従来法はあまり役立たない。食品そのものの検査の他に、製造環境の汚染度を監視するために、環境微生物検査も欠かせない。製造機器や周辺資材の微生物検査、作業従事者の衛生検査、空気の清浄度検査など多岐に渡る。そこで求められる検査も作業上の簡便性、迅速性、判定の容易さ、正確さ、そして低コストである。

5. 微生物検査の簡易迅速化の現状

前述したように、食品衛生検査指針による微生物検査法はかなりの時間と労力を必要とする。また、食中毒菌検査の場合では、その作業が多岐にわかれ、時間も増大し、専門的な技術も必要となる。このため、今や食品製造現場における自主衛生検査ではこれらの作業を機械化したりその他の手法を用いたりすることで、全体の検査を軽減化・簡易化・迅速化する傾向が加速している（図3）。

食品から生菌数を簡易迅速に測定する手段として、現在主流の簡易迅速測定技術は次のように大別することができる。（1）微生物を直接観察できるまで培養して検出するための労力を軽減する方法、（2）微生物の生存に伴う代謝に関連する物質を測定することで生菌数に換算する方法、（3）高感度な測定器を用いて菌数を直接計数する方法、の3つである。（1）では、スパイラルプレーターという装置を用いての寒天平板塗抹の自動化、既成培地やスタンプ型・フィルム型培地の導入による培地作製の労力およびサンプリングの簡易化、メンブランフィルター法によるマイクロコロニーの検出、コロニーカウンターによる画像処理での自動計数装置の導入、（2）では、ATPを指標とした検査法、微生物の増殖の際に培地内で起こる化学的変化を電気抵抗度・伝導度を測定するインピーダンス・コンダクタンス法、（3）では、微粒子数測定機器であるフローサイトメーターによる計測、などが挙げられる。

一方、食中毒菌の検出の場合では、それぞれの食中毒菌に対して特異的な検出マーカーが必要であり、迅速検出に使われる主なものとして、（4）標的微生物

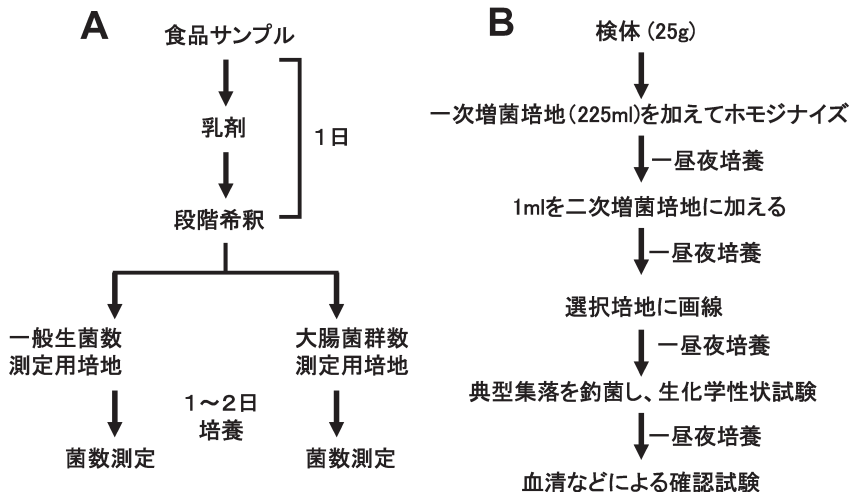


図3 従来法による食品中の生菌(A)および食中毒菌(B)検査

の特異的酵素を検出する方法，(5) 標的微生物に特異的な抗原を認識する抗体を用いる方法，(6) 標的微生物の特異的な遺伝子を検出する方法，が用いられている。(4) では合成酵素基質培地，(5) では免疫磁気ビーズやELISA，イムノクロマトグラフィー法，(6) ではPCR法やその他の遺伝子増幅法，などが挙げられる。

6. 食品総合研究所での開発技術

(1) 化学発光法による微生物生菌数迅速検出システムの開発

従来法の微生物検査では結果が得られるまで数日を要し，細菌に関する専門知識も必要とされる(図3)。現在，最も迅速な食品からの生菌検出手法としてはATP法がある。これは，生命活動由来のATPをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による蛍光で捉え，生菌検出を行う手法である。当日検査が可能であるが，1検体当たりの試薬コストが約250円必要である。また微生物由来のATP以外のATPが多い試料(食肉加工品など)では，食品由来のATPを消去する試薬が必要である。さらに熟練を要する微生物溶菌操作が前処理として必須である。そこで食品衛生対策チームでは，化学発光法に着目して，より低コストかつ簡便で迅速な生菌測定技術を開発した(株式会社日研生物医学研究所・アトー株式会社との共同研究)。

本法は，生菌の存在する溶液中に，メナジオンなどのキノン類を添加することにより，細菌表層に存在する酵素[NAD(P)H:キノン酸化還元酵素]で活性酸素を生成させ，この活性酸素を発光試薬により瞬時に捉えて生菌の検出を行う手法である(図4)。

本手法は，原理に示したとおり生菌中の酵素反応により最終的な発光が得られる。死菌にも同酵素は存在するが，活性に必須な補酵素NAD(P)Hの細胞内濃度レベルが死菌では極端に低下しており，実質的には生菌のみを検出できると考えられる。

発光積算値は試料中の細菌数と相関があり，この関係を菌数測定に利用している。すなわち，生菌数と試料の発光積算値が閾値(無菌条件での発光値レベル)を超えるのに要する時間との間に直線関係が成り立つ(図4)。発光検出は，メナジオンと検体を10分間反応させ，発光試薬を分注するという簡便な操作後に2~10秒間の発光測定を行うことで終了する。ATP法と異なり，微生物細胞の溶菌操作なしで生菌の検出ができ，しかも1検体あたりのコストも15円以下である。直接検出可能な範囲は $10^4 \sim 10^8$ CFU/mlであり，検体中の生菌がこの範囲であれば1検体10分で，検体の生菌が 10^4 CFU/ml以下の場合，増菌培養することにより，従来法より短時間で検出可能であり，また無菌試験は約7時間程度で行える。そして多検体処理発光測定装置(アトー，AB2300)と96ウェルマイクロタイタープレートを用いることにより，自動的に15~30分程度で多数の検体の発光計測が

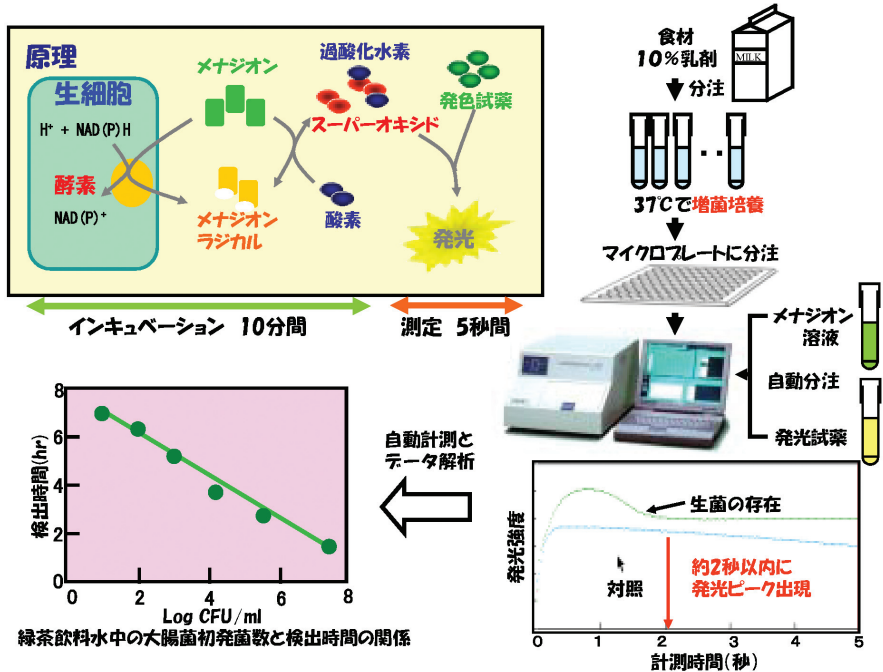


図4 化学発光法の原理と生菌検出システム

終了できる。また、測定結果が数値として示され、測定結果の記録保存も行いやすい(図4)。

一部の食品(清涼飲料・惣菜など)については、すでに本手法を用いて汚染菌の定性、定量的な検査が可能であることを実証している。化学発光法では、活性酸素を発光試薬で検出することから、被検体中に食品由来のビタミンCやポリフェノール類などの抗酸化物質が過剰に存在した場合、生菌とメナジオンの反応から発生した活性酸素が消去され、実際の生菌数よりも少なく見積もられてしまう。従って、適用食品ごとに阻害物質を想定し、測定が影響を受けた場合は、個々にその影響を排除する手法を確立する必要がある。

化学発光法はその原理から食品中の一般生菌数を捉えることになるため、広く微生物検査の現場において利用できる。当日に検査が完了するため、安全に生食用としてそのまま利用できるか加工調理を行うべきかの判断が迅速にでき、食品工場に搬入された肉・魚類・野菜類などの生鮮原材料の品質検査に威力を発揮すると期待される。また増菌培地に選択培地を用いることにより、特定の食中毒菌の迅速検知にも利用可能である。実際、化学発光法による迅速生菌数測定試薬キッ



迅速生菌測定キット
(簡便・高感度・経済的)

一般生菌数・食中毒菌
測定用の市販増菌・選択培地

図5 化学発光法による市販の迅速生菌測定キットと選択培地

トに加え、黄色ブドウ球菌，腸管出血性大腸菌O157，サルモネラおよびリステリア菌などの食中毒菌に対する化学発光法検出用の選択培地が開発され，株式会社日研生物医学研究所より販売されている（図5）。

(2) PCR法による食中毒菌の迅速同時検出法

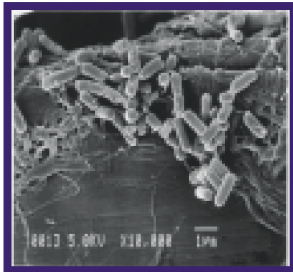
微生物をはじめ，生物はその生物の設計図である遺伝子，DNAを保有している。そのDNA配列のうち食中毒菌しか持たない特異的遺伝子を指標として，その有無を検出すれば標的菌の存在の有無を知ることができる。PCR法とは遺伝子の特定の箇所のみを大量に試験管内で増幅する手法である。すなわち標的菌の特異的遺伝子配列に対するプライマー1対と耐熱性ポリメラーゼというDNA合成酵素と反応試薬を用いて，指数関数的に特異的標的遺伝子を複製する。反応液中に含まれる複製した遺伝子産物を電気泳動法で確認し，目的産物の有無を観察することで結果を得る。反応にはサーマルサイクラーという特殊な温度管理装置が必要となるが，反応に必要な時間は約2～3時間である。検出感度は理論上1分子の標的DNAが反応管に入っていれば検出できる。実際，一つの細胞に相当するゲノムDNA量が存在すれば検出できる。

食品衛生対策チームでは，規制により食肉に存在してはいけない（zero tolerance）サルモネラ，リステリア・モノサイトゲネス，病原大腸菌O157:H7の3種の食中毒菌（図6）をPCR法により一度に高感度で同時に検出できる技術をプリマハム株式会社との共同研究で開発した。

技術開発のポイントは①通常汚染菌数の極めて低い食品から3菌種が同時に増殖可能な培地の開発，②有機溶剤を用いない安全，簡便かつ効率の良いDNA抽

出法の確立，③各菌種の特有遺伝子増幅用プライマーの選定とPCR反応条件の至適化である。

本技術は，①従来の公定法に比べ操作が簡便で，同定までの時間が大幅に短縮できる（図7），②1分子の標的DNAが反応チューブに混在すれば検出可能であり，極めて高感度（図8），③同時検出できることから検査費用の大幅削減・作業の効率化につながるなどの利点を持っている。従って，多くの食品製造現場での簡易・迅速な自主衛生管理手法としての普及や食中毒事故発生の際の原因菌同定のための検査への利用などに期待できる。現在，国内・国際特許出願中であり，実用化に向けた同時検出キットの開発が進行中である。



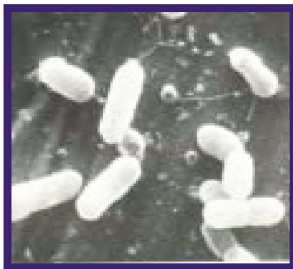
腸管出血性大腸菌O157:H7

- ・極めて少菌量で発症
- ・重篤（溶血性尿毒症で死亡例）
- ・乳幼児、老人に高リスク



サルモネラ属菌

- ・発生件数が多い
- ・少菌量での発生事例あり
- ・発症者から長期間排菌



リステリアモノサイトゲネス

- ・欧米で発症
- ・低温でも増殖
- ・少菌量で発症、重篤
（髄膜炎・敗血症で死亡例）

図6 食肉由来の主要食中毒菌

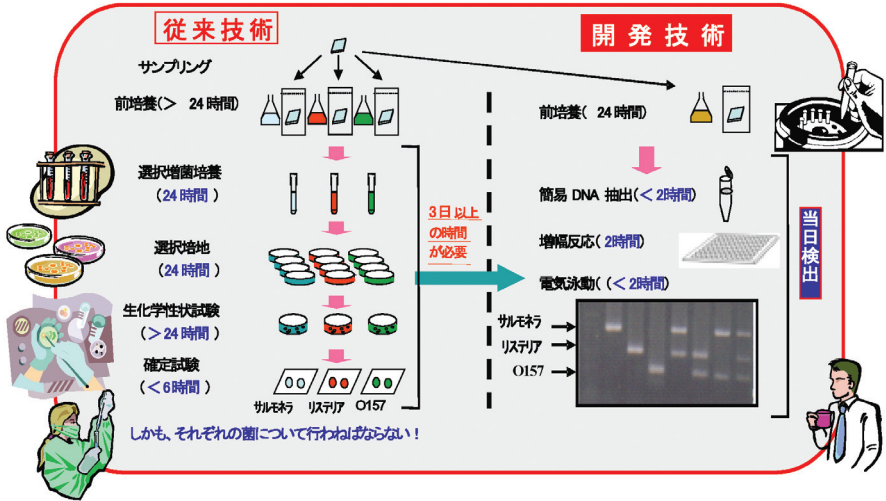


図7 従来法と本法との比較

・豚挽肉（細菌数： 10^3 CFU/g）
 ・各病原菌接種量：
 $10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1}$ CFU/25g

開発培地による
 増菌培養：20時間

増菌培養液1mlからの
 菌体の回収、DNA抽出

接種菌数 (CFU/25g)	同時検出法による判定		
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
10^2	+	+	+
10	+	+	+
10^0	+	+	+
10^{-1}	-	-	-

＋：陽性、－：陰性

食肉中に 10^0 CFU/25gの病原菌が存在すれば検出
 →公定法と同レベルで検出可能

図8 豚ひき肉での本技術の検出感度の検証

(3) 温度管理不備を検知する微生物センサーの開発

食品の安全性確保のためには、生産から加工・流通を経て消費に至るフードシステム全体に渡って腐敗菌や食中毒菌の汚染・増殖を抑えることが極めて重要な課題となっている。すなわち、食品の微生物学的安全性確保には、原材料への初期汚染防止、食品中の微生物殺菌および殺菌処理後に残存する微生物の増殖抑制をできる限り行うことが大切である。

また最近の食生活においては、食品素材の持つ食感・機能性・栄養性などを重視した生食志向がもてはやされる時代となり、生鮮生食食材や最少加工食品などの消費が急速に伸びている。このような非加熱食品は、従来の加熱加工食品に比べ、食中毒菌など病原菌の汚染リスクが高い。非加熱食品の流通段階での食中毒菌等によるリスクを低減するための最も有効な手段は、低温管理（冷蔵・冷凍）である。現在では、日本国内においても産地からの新鮮な食材や食品工場で製造された加工製品の小売店や消費者への流通は、昔のように地域的に限られたものではなく、全国規模に及んでいる。従って、食材・食品の流通段階での微生物学的安全性確保は益々重要となる。衛生管理の行き届いた工場で製造された食品においても流通過程での温度管理の失敗は食中毒事故等の要因となりうる。特に近年、低温でも増殖可能なリステリア菌等の病原菌による食中毒事例が欧米先進国で報告され、我が国でも温度管理の厳密さが求められるようになってきている。そこで我々は、温度管理の不備に伴う食中毒リスクの回避を目的として、大成ラミック株式会社との共同研究で安価かつ簡便な温度管理用微生物センサーを開発した。

I. 開発のコンセプト

センサー開発をするにあたって、生食用の食材（農畜水産物）とその最小加工食品（カットサラダ・刺身・生肉などのパック商品）や弁当・惣菜などの Ready-to-eat (RTE) 食品のような微生物リスクを低減するために低温管理（冷凍保存品は対象外とした）が必須な広範な食品に適用できることを大前提とした。またこれら食品の管理温度は、個々で異なっており一般的に 4℃～20℃の範囲である。従って少なくともこの温度範囲の所定管理温度で利用できるセンサー設計が可能であることが必須である。そしてセンサーの基本必要事項として

- ・低コストであること（一個あたり10円以下が望ましい）
- ・温度管理不備の判定が一目で分かること（簡便迅速判定）
- ・安全であること
- ・コンパクトなサイズであること（個々のパッケージ商品に装着可能）
- ・ある程度保存可能なもの

を挙げ、検討した。

上記の基本必要事項をすべて満足するようなものとして我々は、バイオセン

サーに着目した。バイオセンサーは、生体の持つ分子識別や代謝機能を巧みに利用したセンサーである。現在、農産物・食品分野への応用を目的として、多くのバイオセンサーの開発・実用化が進んでいる。生体触媒（酵素）・生体親和物質（抗体・レセプタータンパク質・DNAなど）・生体自身（微生物細胞・培養細胞など）などを分子識別素子として用い、アナライト（対象物質：例えば残留農薬や機能性成分など）との反応で生じるシグナル（化学物質・熱・光など）を物理化学的デバイス（電極半導体・サーミスター・フォトンカウンターなど）を介して電気信号に変換し高感度に検出する原理を用いたものが現在主流である。我々が目指しているセンサーには、物理化学的デバイスとの組合せは、安全性・コスト・サイズの面で不適である。そこで安全な食品微生物の乳酸菌或いはパン酵母の発酵能自体の利用を考えた。すなわち乳酸発酵の酸生成による天然色素のpH依存的な色調変化或いは糖の発酵による二酸化炭素（気体）発生により一目で簡単に温度管理不備を検知できる微生物センサーの作成が可能ではないかとの発想から検討を行った。以下の理由から最終的にパン酵母を用いた温度管理用微生物センサーの実用化に向けた開発研究に集中することとした。

- ①長年の食経験によるパン酵母の安全性。
- ②パン酵母の糖を発酵してエタノールと二酸化炭素を生成する代謝活性は、温度低下と共に減少するが0℃付近まで認められる。
- ③種々のパン製造（低糖生地・高糖生地など）に適した高品質のパン酵母細胞が安価で生イーストとして業務用に販売されている。
- ④我が国では、特に冷凍生地パンに適した優れた冷凍耐性パン酵母が開発・販売されている。

パン酵母を用いた温度管理用微生物センサーの原理を図9に示した。

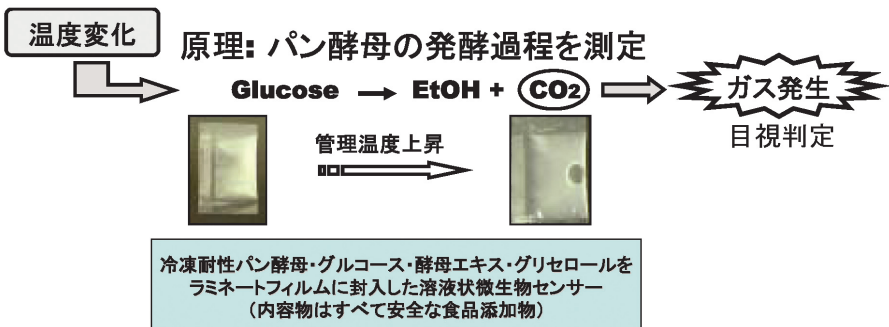


図9 温度管理用微生物センサーの原理

センサーは、気密性のラミネートフィルムにパン酵母細胞・グルコース・酵母エキス・グリセロールを含む溶液を封入した小袋状とした。酵母エキスとグリセロールの添加濃度は、それぞれ0.5% (w/v) および10% (v/v) とした。センサーに用いるパン酵母は、業務用に販売されている低糖冷凍生地用のFC生イースト（日本タバコ株式会社より提供）とした。センサーに含まれる成分は、食品添加物として認可されている安全なものばかりである。

II. パン酵母を用いた温度管理用センサーの基本設計と評価

実用化に向けたセンサーの基本設計のために実験室レベルで以下のような検討を加えた。

1) グルコース添加濃度と微生物センサーの最大ガス発生量との関係

パン酵母添加量を固定し、グルコースの濃度を变化させた場合のセンサーの最大ガス発生量（30℃で2日間放置）を調べた結果、グルコース添加濃度増加に比例して、最大ガス発生量も増大し、添加濃度3%以上ではセンサーの破裂がおきそうなほどのガス発生量に達することが明らかとなった（図10）。0.1%の添加濃度でも、充分目視で確認できるガス発生量が観察された。この結果から、添加グルコース濃度の調節によって最大ガス発生量をセンサーの破裂を回避しかつ容易に目視できるように調整可能ながことが明らかとなった。そこで以後の実験では、添加グルコース濃度を1%とした。

2) 凍結保存によるセンサーの安定性

前述のように実用化する際には、微生物センサーはある程度保存ができることが重要である。保存法としては、パン酵母の発酵能を指標としておりその機能を使用直前まで完全停止させるには凍結保存が望ましい。しかしながら、通常のパ

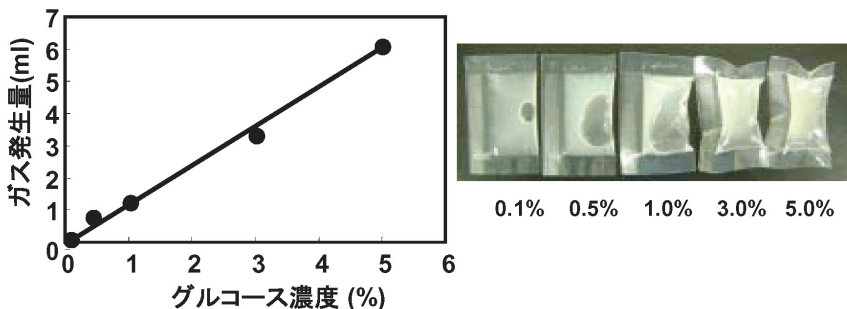


図10 グルコース添加濃度とセンサーの最大ガス発生量との関係

ン酵母は、パン生地の状態で冷凍しても細胞が凍結障害を受け、解凍後の発酵能は極端に低下し、ふくらみのすくないやせたパンしかできない。この問題を解決するために、冷凍しても発酵能が低下しない冷凍耐性パン酵母の開発が日本を中心として精力的に行われ、最近では高品質の冷凍耐性パン酵母が業務用に販売されるようになった。これにより、冷凍耐性パン生地製法が可能となり、現在のようどこでも消費者が焼き立てパンを購入できるようになった。

我々は、開発当初からセンサーの保存性を考慮し、前述のように多種の業務用のパン酵母の中でも冷凍耐性パン酵母の利用を選択した。そこで、センサーの凍結保存の安定性に関して検討した（図11）。センサーの添加グルコースおよびパン酵母濃度はそれぞれ1%および5 mg/mlとした。センサーを所定期間冷凍保存したのち、10℃でのガス発生能を凍結前のコントロールと比較した。目視でガス発生が確認できるまでの時間（ガス発生誘導時間）とガス発生速度に関して、凍結保存1週間では、コントロールと変わりなかった。一方、2週間保存では、誘導時間が2時間ほどコントロールに比べ遅延した。さらに3週間保存以降は、特にガス発生速度がコントロールに比べ大幅に低下した。これらの結果から、センサーは1週間安定に凍結保存ができることまた冷凍耐性酵母を用いた場合においても凍結保存2週間目頃から細胞に凍結傷害が現れ性能が低下することが明らかとなった。

3) パン酵母添加濃度と微生物センサーのガス発生能との関係

センサーのパン酵母添加量がガス発生誘導時間とガス発生速度に及ぼす影響を20℃、10℃および5℃で調べた。図12には、10℃および5℃の結果を示した。各

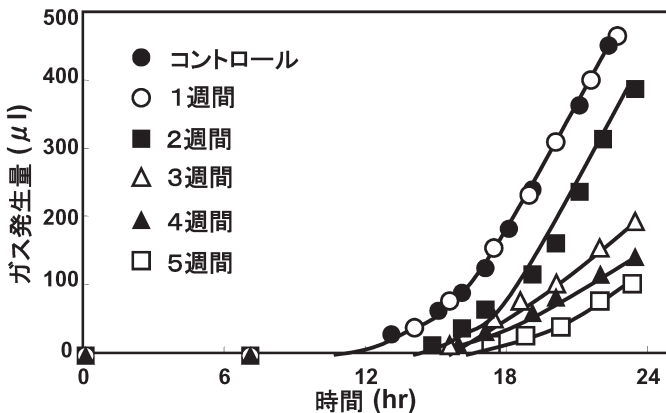


図11 10℃でのセンサーガス発生能に及ぼす凍結保存の影響

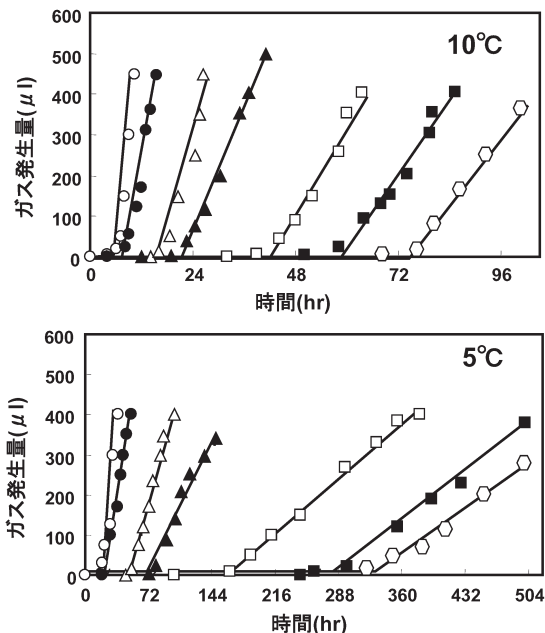


図12 低温下でのセンサーのガス発生能に及ぼすパン酵母添加濃度の影響
 パン酵母の添加濃度が0.2mg/ml (◇), 0.5mg/ml (■), 1 mg/ml (□), 2.5mg/ml (▲), 5 mg/ml (△), 10mg/ml (●) および15mg/ml (○) のセンサーの各低温度におけるガス発生能を測定した。センサーのグルコース添加濃度は1%に固定した。

低温度においてガス発生誘導時間は、ガス発生速度と酵母添加濃度に関して反比例関係にあることが明らかとなった。すなわち、酵母添加量の減少に伴いガス発生誘導時間の遅延とガス発生速度の低下が観察された。また同じ酵母添加量のセンサーでは、温度低下に伴い、ガス発生誘導時間の遅延とガス発生速度の低下が観察された。特に5℃では、低濃度の酵母添加量(2.5mg/ml以下)においてガス発生速度の大幅な低下が認められた。これらの結果から、低温においてセンサーのガス発生誘導時間とガス発生速度をパン酵母添加濃度の調整によりコントロールできることが明らかとなった。すなわち、個々の食品の低温流通温度と賞味期限や輸送時間に適した温度管理用のセンサーの作成ができることが示唆された。

4) 温度上昇の繰り返し変化が微生物センサーのガス発生に及ぼす影響

センサーがはたして管理温度不備を正確に検知できるかを検証するために、パン酵母添加濃度10mg/mlの微生物センサーを用いて、2時間毎に5℃と10℃の間で温度変化を与えた場合のガス発生を測定した(図13)。

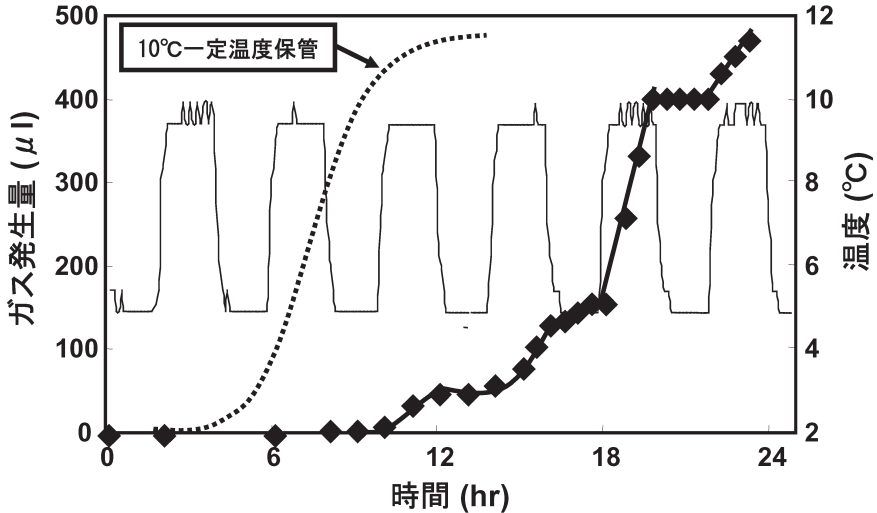


図13 2時間ごとの5℃と10℃間の温度変化を負荷した場合の微生物センサーのガス発生経時変化

パン酵母及びグルコース添加濃度がそれぞれ10mg/mlおよび1%の微生物センサーに温度変化を負荷した場合のガス発生の経時変化を実線(◆)でまた10℃の一定温度保管した場合を破線で示した。実際の温度変化(細線)は、自動温度記録計により連続的にモニタリングした。

図12に示したようにこのセンサーを5℃および10℃の一定温度で保持した場合のガス発生誘導時間はそれぞれ27時間および4時間である。図13から明らかなように、3度目の10℃への温度上昇で初めてガス発生が目視で検出可能となり、以後ガス発生量は10℃への温度上昇時のみに増加した。従って、この温度変化実験において微生物センサーのガス発生は、10℃への温度上昇のみが関与することが明らかである。これらの結果は、食品が温度不備に置かれた時間をセンサーのガス発生量で推定可能であることを示すものである。

以上の結果から、低温管理が必要な生鮮或いは最小加工食品などの非加熱食品に関して、それぞれの品目の流通・保管温度の適したオーダメイドの微生物センサーの作製が可能であると考えられた。

Ⅲ. 微生物センサーの大量生産システム開発と実際の流通現場での設計

1) 微生物センサーの実用モデルと大量生産システム

実際の流通現場での実証試験のために、実用モデルのセンサーは、個々の食品のパッケージ外表面に添付しやすい内寸2cm×2cmの大きさとした(図14)。ま



微生物センサー
(実用化モデル:実寸大)



液体粘体高速自動充填機



自動連続両面テープ貼り合わせカット機

図14 微生物センサーの実用モデルと大量生産システム

た開発した液体粘体高速自動充填機により、センサーをロール状に連結した形態で大量生産（1時間当たり24,000個以上；作成するセンサーのパン酵母添加濃度が低ければ低いほど生産能力は増大）が可能となった。さらに個々のパッケージ商品へのセンサー貼り付けを容易にする自動連続両面テープ貼り合わせカット機も開発した。このような自動化大量生産システムの開発により、微生物センサーのコストは1個あたり数円程度と極めて安価になることが試算された。

2) 実際の流通現場でのセンサー設計

地域で多くの店舗を有する大手スーパーにおいて、低温管理が必要なサラダ・生肉などの最小加工食品や惣菜・弁当などのRTE食品は、一般に衛生管理の行き届いた単独或いは少数の工場が多品目が一括して製造され、各店舗に低温輸送される。各店舗では、品目毎に設定された管理温度で商品を陳列し販売する。温度センサーの使い方としては、輸送段階での温度管理や消費期限までの温度管理などが考えられる。前述のように製造工場の局在化により各店舗への輸送時間も当然異なる。従って、温度センサーの実用化にあたっては、各食品の異なる管理温度・消費期限や店舗までの輸送時間の相違を考慮し、それぞれの食品企業の温度管理の目的に適したオーダーメイドのセンサー設計が必要である。

そこで茨城県内の大手スーパーの協力を得て、実際の流通現場での温度センサーの設計を検討した。対象食品としては、10℃管理の惣菜・サラダなどのパッ

ク商品（消費期限は48時間と72時間の食品を含む）および4℃管理のスライス肉・ひき肉のパック商品（消費期限は72時間：製造工場から店舗までに輸送時間は8時間以内）とした。10℃管理食品に関する結果を例として図15に示した。この場合の製造工場から店舗までの輸送時間は、15時間以内である。通常、パック商品は、同一管理温度の多品目をバットに入れ、冷蔵車に積載し店舗まで輸送される。そして店舗でそれぞれの陳列棚に仕分けされる。そこでバットの側面に輸送中の温度のモニタリングのため連続自動温度記録計を取り付けると共に各パック商品にパン酵母添加濃度の異なる6種類のセンサーを貼り付け輸送した。店舗に到着後、直ちに温度管理の厳密な10℃冷蔵保存庫に消費期限まで保管した。そして各微生物センサーの輸送開始から保管終了までガス発生量を測定した。図15から、輸送段階の温度管理にはセンサー2（ガス発生誘導時間 15時間）また消費期限までの温度管理にはセンサー4（ガス発生誘導時間 48時間）とセンサー6（ガス発生誘導時間 72時間）が有効であることが明らかとなった。すなわちセンサー2で店舗到着時に明らかなガス発生が肉眼で認められれば、輸送段階での温度管理不備を示すものである。同様に、4℃管理の生肉製品の輸送段階および消費期限までの温度管理に適した微生物センサーの設計もできた。

これら設計が完了したセンサーを用いて、低温管理が必要な食品にとっては

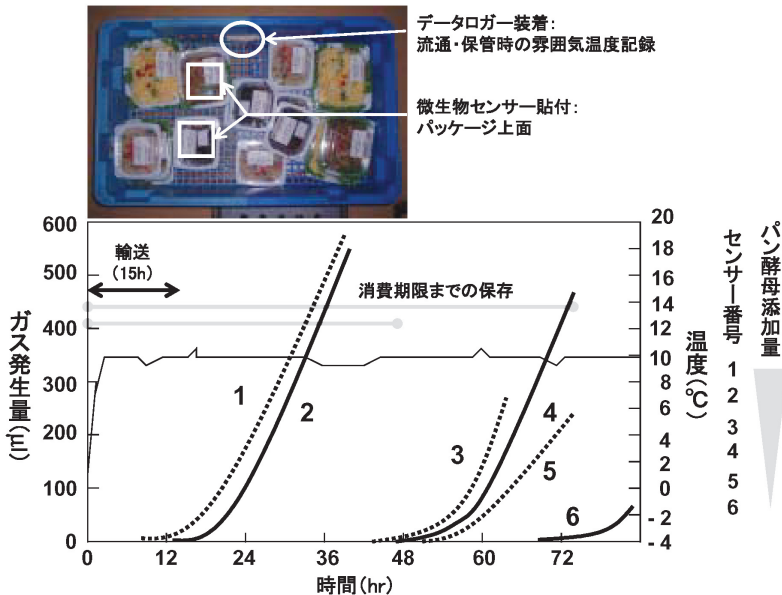


図15 流通管理温度10℃の実際食品に適したセンサーの設計

温度管理不備による食中毒リスクが高くなる夏期での本格的な実証試験を今年（2005年）行う予定である。

開発した温度管理用の微生物センサーは、酵母がパンを膨らます原理すなわち酵母が糖を発酵して炭酸ガスを放出するが、その発酵は温度が高くなるほど活発になることを利用している。センサー自体は、パン酵母や糖（ブドウ糖）などからなる溶液をフィルムに密封した単純なものである。食品によって、低温流通の温度域は異なるが、パン酵母と糖の量を調整すれば、品目毎に温度や流通時間の設定を変えて、オリジナルのセンサーを作れる。温度管理が不備なほど、炭酸ガスが増えて袋がふくらみ、誰にでも肉眼で異常が確認できる。個々のパッケージ商品に貼り付けやすいようにセンサーの袋部分は2cm角の大ききで、その内容物は、ほかに発酵を促す酵母エキスなど、すべて食品に使える安全なものである。またセンサーは、使用まで作製後1週間は安定に凍結保存できる。大量生産できる機械も整え、1個数円と低コスト生産が可能である。現在、国内外に特許出願中である。開発したセンサーは、低温管理が必要な最小加工食品やRTE食品などの個々のパックに製造工場の出荷段階で貼れば、流通段階や家庭での温度管理に失敗がないかどうかがつかめ、食中毒防止などの衛生管理に役立つことが期待される（図16）。また生鮮野菜や果実などの低温流通で、適切な積載方法を確認する試験などにも生かせる。

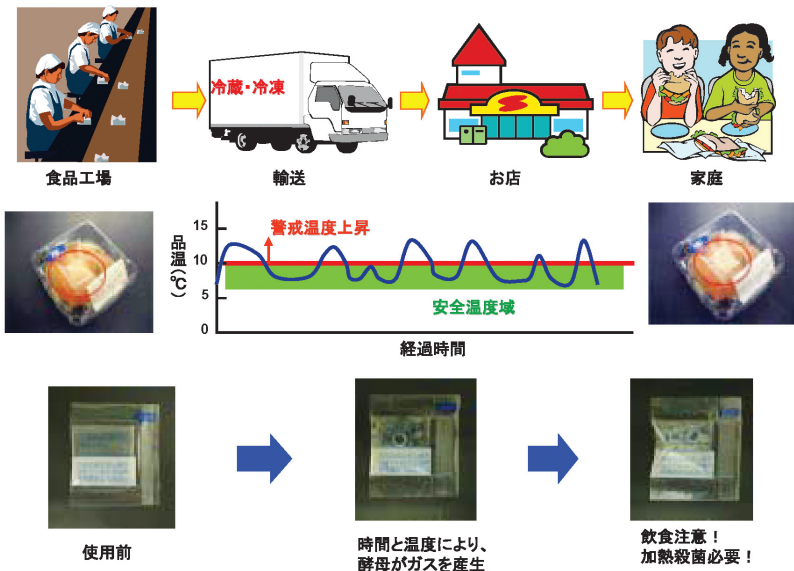


図16 温度管理用微生物センサーの利用イメージ

おわりに

最近の食に対する消費者ニーズの多様化は、輸送手段・技術の発達も相まって、食材や加工食品流通の急速なグローバル化を促進している。それに伴い、一国・地域に例えば病原大腸菌O157や狂牛病のプリオンのようなリスクの高い危害要因による食品事故が発生すると、当該国・地域にとどまらず国際的に波及する状況にある。そして我が国の食料自給率は、カロリーベースで約40%と先進諸国のなかではとりわけ低く、食料の多くを海外からの輸入に依存している。また近年の医療技術の発展、衛生環境の改善、さらには少子化傾向などにより、我が国では高齢化社会が急速に進行しつつある。高齢者は、病原菌などの感染に対して高リスク群である。さらに食生活においては、食品素材の持つ食感・機能性・栄養性などを重視した生食志向がもてはやされる時代となり、生鮮生食食材や最少加工食品などの消費が急速に拡大している。このような非加熱食品は、従来の加熱加工食品に比べ、食中毒菌などの汚染リスクが高い。特に最近では、近隣アジア諸国からの非加熱食品の輸入が増大傾向にある。従って、食品の安全性確保のためには、従来にもまして国際協力も視野に入れた「農場から食卓までの連続した衛生管理」を徹底することが重要となる。

そのためには、実用的な迅速・簡便・高感度な微生物検出技術および高齢者などの高リスク群のための安全な食品を供給できる微生物制御技術の開発は、緊急かつ最重要課題である。

謝辞

本研究の一部は、農林水産省の「民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業」、 「食品の安全性と機能性に関する総合研究」の助成を受けて進められたものである。

(企画調整部 食品衛生対策チーム 川本 伸一)

引用文献

- 1) Okutani, A., Okada Y., Yamamoto S., and Igimi S. *Int. J. Food Microbiol.* 93:131-140 (2004).
- 2) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S. *J. Food. Prot.*, 68: 551-556 (2005).
- 3) Kawasaki, S., Yamashoji, S., Asakawa, A., Isshiki, K., and Kawamoto, S. *J. Food. Prot.*, 67: 2767-2771 (2004).
- 4) Yamashoji, S., Asakawa, A., Kawasaki, S., and Kawamoto, S. *Anal. Biochem.*, 333:303-308 (2004).
- 5) 川本伸一：「微生物を用いた評価技術の開発」, 農林水産文献解題 No.30

食品の生体機能調節に関する研究, 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 財団法人農林統計協会, p21-28 (2004).

- 6) Nakamura, H., and I. Karube., *Anal. Bioanal. Chem.*, 377:446-468 (2003).
- 7) Shima, J., Y. Sakata-Tsuda, Y. Suzuki, R. Nakajima, H. Watanabe, S. Kawamoto, and H. Takano., *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:715-718 (2003).
- 8) Kogure, H., Kawasaki, S., Nakajima, K., Sakai, N., Futase, K., Inatsu, Y., Bari, M. L., Issiki, K., and Kawamoto, S., *J. Food. Prot.*, 68: 182-186 (2005).
- 9) 川本伸一. 食品と工業, 48:40-48 (2005).
- 10) 川本伸一, 川崎晋, Md. Latiful Bari, 稲津康弘, 橘田和美. 食品の試験と研究, 39: 54-58 (2005) .

トリコテセン系マイコトキシンの産生と制御

1. はじめに

カビが産生する二次代謝産物の中で、人または家畜の健康をそこなう有毒物質であるカビ毒をマイコトキシンと呼び、マイコトキシンによって引き起こされる疾病をかび中毒症または真菌中毒症と呼んでいる。

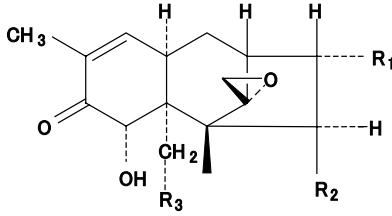
マイコトキシンによる中毒症は人類の歴史と共に発生していたと考えられる。マイコトキシンによる人の病気に関する最も古くから知られているものは、麦角菌による中毒である。国内でマイコトキシンが注目を浴びようになったのは、1953年輸入米によって起こった黄変米事件である。この事件を契機として、我が国におけるマイコトキシンの研究が軌道に乗ってきたのである。

マイコトキシンがさらに世界的に注目され、マイコトキシンに関する研究に対しあらゆる意味で新しい時代の扉を開いたのがアフラトキシンの発見である。アフラトキシンは、1960年英国で起こった10万羽以上の七面鳥の中毒事件を発端として発見されたマイコトキシンで、強い毒性と発がん性を有している物質である。このアフラトキシンが注目されたのは、天然物質の中で最も発がん性が強いことと、世界的に見て農産物への汚染が広く発生していることである。

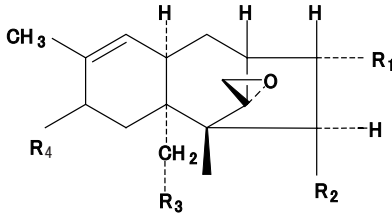
トリコテセンとは、12位と13位にエポキシド基をもつ特有の骨格を有する化合物である。トリコテセン系マイコトキシンとしては、ムギが赤かび病により罹病した際、産生されるデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV) が、有名である。また、日本の栽培キノコであるエノキタケ (*Flammulina velutipes*) から分離した *Spicellum roseum* により産生された8-デオキシトリコテシンなどがある。

図1に主として *Fusarium* 属菌が産生するトリコテセン系マイコトキシンと、8-デオキシトリコテシンの構造を示した。

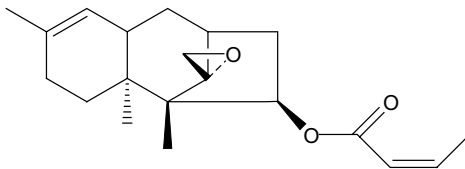
Fusarium 属菌は植物病原菌として良く知られているが、一方、穀類などにも増殖し、ヒト、家畜、家禽に障害をもたらす有毒代謝物を産生することから、近年注目されている菌類である。*Fusarium* 属菌の有毒代謝物として、12, 13-エポキシトリコテセン類と総称される一連の化合物およびマクロライド系のマイコトキシンに分類されるエストロジェン様物質ゼアラレノン (ZEA) が最も問題視される。また、最近話題となっているマイコトキシンとして、発がん性もあるといわれるフモニシンがあげられる。さらにブテノライド、モニリホルミン、フザリン酸等もマイコトキシンの中にも含まれているが、それらの物質の中毒例における役割についてはまだ十分に明らかにされていない。ここでは、トリコテセン系マイコトキシんに焦点をあてて、記述することにする。



	R ₁	R ₂	R ₃
デオキシニバレノール	OH	H	OH
3-アセチル-デオキシニバレノール	OAc	H	OH
15-アセチル-デオキシニバレノール	OH	H	OAc
フザレノン-X	OH	OAc	OH
ニバレノール	OH	OH	OH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
T-2トキシソ	OH	OAc	OAc	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ OCO
HT-2トキシソ	OH	OH	OAc	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ OCO
ディアセトキシシルベノール	OH	OAc	OAc	H
ネオソラニオール	OH	OAc	OAc	OH



8-deoxy-trichothecin

図 1 主として *Fusarium* 属菌が産生するトリコテセン系マイコトキシソと 8-デオキシ-トリコテセンの構造

2. 赤かび病菌の産生するトリコテセン

1) 赤かび病菌の産生するトリコテセンとムギへの汚染

ムギ粒が*Fusarium graminearum*等の感染を受けると変色するだけでなく、トリコテセン系のマイコトキシンやZEAで汚染されるため、著しく品質が劣化する。トリコテセン系マイコトキシンとしては、多くの種類が知られているが、トリコテセン系マイコトキシンの中で自然汚染が確認されているのは、ジアセトキシシルベノール(DAS), T-2 トキシシン(T-2), DON, NIV, 3-アセチル-デオキシニバレノール(3-Ac-DON), 15-アセチル-デオキシニバレノール(15-Ac-DON), およびフザレノン-X (Fus.-X) の7種である。

ムギ類の赤かび病罹病穂から分離される*Fusarium*属菌は,*F. graminearum* (完全世代*Gibberella zeae*)であることが多い。本菌は我が国では古くからムギ類赤かび病菌として知られ、DONやNIVの自然汚染のみが言及されていた。しかし、近年赤かび病には本菌以外の*Fusarium*属菌が関与することが知られ、これらの菌の国産農産物のT-2の自然汚染についても取りざたされている。なお、田中敏嗣らにより示されたように、1976年から2001年産の国産および外国産のコムギおよびオオムギ粒からはいずれもDONおよびNIVが検出されている¹⁾。表1に示した。

また、Yoshizawa²⁾は、国産のコムギおよびオオムギ粒からDON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, Fus.-XおよびNIVを検出し、日本の北部では主にDONが検出され、中部では主にNIVが検出され、西日本ではDONとNIVが検出されたが、DONの量はNIVの量に比べて四国では少なく、九州では多いという結果を得ている(表2)。

2) トリコテセン系マイコトキシンの毒性

トリコテセン系マイコトキシンの毒性は、マウス、ラット、モルモット、ネコ、馬等で調べられているが、一般に急性毒性はかなり強いが、発がん性は認め

表1 コムギおよびオオムギ粒中のデオキシニバレノールおよびニバレノールの汚染状態

コムギおよびオオムギの穀粒 産地	テスト数	収穫した年	DON	NIV
			平均濃度(ng/g)	平均濃度(ng/g)
国内産コムギ	36	2001	388	8.2
輸入コムギ	20	2001	100	1.3
国内産コムギ(近畿地域)	3	1984	270	633
国内産オオムギ(近畿地方)	2	1984	303	920
韓国産コムギ	9	1984	23	535
韓国産オオムギ	31	1984	124	489
外国産コムギ	222	1983-85	188	59
外国産オオムギ	139	1983-85	109	296
国内産コムギ	17	1976-92	1,545	669

(田中敏嗣らによる)

られていない。マウスに対するLD₅₀ (i.p.) は、それぞれDONは雄マウスで70 mg/kg, 雌マウスで49.4 mg/kg, 3-Ac-DONは雄マウスで76.7 mg/kg, 雌マウスで46.9 mg/kg, Fus.-Xは3.3 mg/kg, NIVは4.1 mg/kg, T-2は3.04 mg/kg, DASは10 mg/kgであった³⁾。

これらのトリコテセン系マイコトキシンの中毒症状としては、悪心、嘔吐、下痢、出血、皮膚炎症、内臓出血、流産等である。日ノ下⁴⁾ は、トリコテセンの毒性影響としての腎障害を研究し、動物実験でNIVを経口投与したマウスに、IgA腎症を見いだしている。IgA腎症というのは、慢性糸球体腎炎（慢性腎炎）である。

表2 国産コムギとオオムギ中粒のトリコテセンの自然汚染

産地(地域/県)	収穫した年	穀物	濃度 (ng/g)			
			DON	3-Ac-DON/ 15-Ac-DON	Fus.-X	NIV
北部/北海道	1990	コムギ	323	tr	—	22
			348	tr	—	10
	1991	コムギ	1,510	10*	—	117
			1,450	tr	—	16
北部/秋田	1990	コムギ	664	11/tr*	—	41
			329	—	—	154
		オオムギ	798	—	—	48
			1,150	—	—	168
中央部/栃木	1990	コムギ	6,120	437/522	171	729
			307	10	60	498
		オオムギ	997	65/96	tr	254
			29	—	tr	367
中央部/京都	1990	オオムギ	86	—	tr	442
		オオムギ	467	161	215	2,860
南部/香川	1990	オオムギ	3,330	347	462	20,300
		コムギ	653	112	—	878
南部/愛媛	1989	オオムギ	368	41	—	645
			448	85	57	226
		オオムギ	634	24	tr	353
			418	93	tr	116
南部/福岡	1991	コムギ	2,090	—	—	450
			570	—	—	200
		オオムギ	11,700	920	—	4,390
			70,500	18,700	—	26,000
南部/大分	1991	コムギ	61,200	11,000	2,470	14,100
			1,620	87	—	750
		オオムギ	698	108	—	475
			523	73	—	246
		オオムギ	2,460	210	—	1,170
			752	170	87	668

15-Ac-DON-----15-アセチル-デオキシニバレノール

* : 15-Ac-DONの濃度, tr : 10 ng/g未満
(芳澤宅實による)

3) 規 制 値

DONの規制は世界的な流れであり、日本でも2002年（平成14年）5月21日にDONの暫定基準値が厚生労働省から示された。すなわち、「小麦に含有するデオキシニバレノールの暫定的な基準値は、1.1 ppmとする」と決められた。

赤かび病被害粒についての規制値が、2002年（平成14年）10月25日に農林水産省から告示として出されている。すなわち、「被害粒のうち赤かび粒は、普通小粒大麦及び普通大粒大麦のうち一等及び二等のもの並びにビール大麦にあっては0.0%、普通小粒大麦（飼料用に供されるもの）及び普通大粒大麦（飼料用に供されるもの）のうち合格のものにあっては10.0%を超えて混入してはならない」とされた。

4) 汚染の除去

農産物が一度マイコトキシンに汚染されると、その分解もしくは除去は難しい。しかしながら、安全な食品を得るために、このマイコトキシンの低減化が必要である。そこでまず、ムギ類を食品加工する段階でトリコテセン系マイコトキシンがどのように推移するかを検討した⁵⁾。赤かび毒であるDONやNIVの汚染度について、精麦および製粉加工による除去の程度について調べた。試料として、オオムギ、ハダカムギの玄麦[※]およびコムギの原麦と精麦した際の各分画を用いた。オオムギは、「あまぎ2条」を用い、玄麦、精麦歩留り55%の精麦、ふすまについてDONおよびNIVの分析を行った。ハダカムギは、「ヒノデハダカ」を用い、玄麦、精麦歩留り60%の精麦、ふすまについて分析を行った。コムギは、「アサカゼコムギ」を用い、テストミル挽砕各ストリーム、原麦、1B、2B、3B、1M、2M、3M、大ふすま、小ふすまの各試料を分析した。また、「セトコムギ」も用い、同様に得られた各試料を分析した。

オオムギについての分析結果を、表3に示した。オオムギについては、玄麦でDON0.51 ppm、NIV0.65 ppmの汚染麦が、55%歩留りの精麦により、95~97%のマイコトキシンが除去された。

ハダカムギについての分析結果を表4に示した。玄麦でDON0.31 ppm、NIV0.48 ppmの汚染麦が、60%歩留りの精麦により93~95%のマイコトキシンが除去された。

コムギについての分析結果は、「アサカゼコムギ」については表5に、「セトコムギ」については表6に示した。コムギについては、製パン、製麺用の粉としては上級の粉から60%になるまで使用するので、1B、1M、2B、2Mが普通製品の粉になると考えると、トリコテセン系マイコトキシンであるDONおよびNIVは83~90%が除去された。したがって、精麦の過程でDONおよびNIVは、オオムギでは95~97%、

※ 玄麦 … オオムギ、ハダカムギの場合

原麦 … コムギの場合

表3 オオムギの分析結果

サンプル	%	マイコトキシン	ppm	ppm/ オオムギ全体	分布 (%)
玄麦	100	DON	0.51		100
	100	NIV	0.65		100
精麦	55	DON	0.04	0.02	3.2
		NIV	0.07	0.04	4.7
ふすま	45	DON	1.32	0.59	96.8
		NIV	1.82	0.82	95.3

注. 'あまぎ2条' を使用.

表4 ハダカムギの分析結果

サンプル	%	マイコトキシン	ppm	ppm/ ハダカムギ全体	分布 (%)
玄麦	100	DON	0.31		100
	100	NIV	0.48		100
精麦	60	DON	0.03	0.018	5.4
		NIV	0.06	0.036	6.6
ふすま	40	DON	0.79	0.316	94.6
		NIV	1.28	0.512	93.4

注. 'ヒノデハダカ' を使用.

表5 コムギの分析結果 (1)

サンプル	重量 g (%)	マイコトキシン	ppm	ppm/ コムギ全体	分布 (%)
原麦		DON	0.37		100
		NIV	0.55		100
1 B	170(18.7)	DON	0.12	0.022	6.2
		NIV	0.15	0.027	4.3
2 B	156(17.1)	DON	0.06	0.01	2.8
		NIV	0.07	0.012	1.9
3 B	45(4.9)	DON	0.09	0.004	1.3
		NIV	0.15	0.007	1.2
1 M	170(18.7)	DON	0.12	0.023	6.4
		NIV	0.18	0.034	5.4
2 M	39(4.3)	DON	0.08	0.004	1.0
		NIV	0.12	0.005	0.8
3 M	14(1.5)	DON	0.20	0.003	0.9
		NIV	0.27	0.004	0.6
ふすま(L)	254(27.9)	DON	0.88	0.246	69.7
		NIV	1.60	0.446	70.6
ふすま(S)	62(6.8)	DON	0.62	0.042	11.9
		NIV	1.41	0.096	15.2
全体	910(100)	DON		0.352	100
		NIV		0.632	100

注. 'アサカゼコムギ' を使用.

表6 コムギの分析結果(2)

サンプル	重量 g (%)	マイコトキシン	ppm	ppm/コムギ全体	分布 (%)
原麦		DON	0.15		100
		NIV	0.26		100
1 B	177(18.6)	DON	0.03	0.006	4.0
		NIV	0.03	0.005	1.6
2 B	160(16.8)	DON	0.03	0.005	3.7
		NIV	0.03	0.005	1.6
3 B	43(4.5)	DON	0.17	0.008	5.6
		NIV	0.35	0.016	5.7
1 M	168(17.6)	DON	0.02	0.003	2.4
		NIV	0.02	0.003	1.0
2 M	42(4.4)	DON	0.01	0.001	0.4
		NIV	0.03	0.001	0.4
3 M	17(1.8)	DON	0.11	0.002	1.3
		NIV	0.16	0.003	1.1
ふすま(L)	277(29.0)	DON	0.34	0.097	70
		NIV	0.75	0.218	78.6
ふすま(S)	70(7.3)	DON	0.24	0.018	12.6
		NIV	0.38	0.028	10.0
全体	945(100)	DON		0.14	100
		NIV		0.277	100

注. ‘セトコムギ’ を使用.

ハダカムギでは93~95%, コムギでは83~90%が除去されることが明らかになった。

5) ムギ粒汚染と防除

コムギについて農薬を散布しなかった場合のトリコテセンの産生量と、農薬を散布した場合のトリコテセンの産生量を調べた結果を図2と図3にそれぞれ示した⁶⁾。品種については、図の左側に赤かび病に対して最も強い抵抗性を示す‘延岡坊主小麦’を配置し、右側になるにつれて抵抗性が弱くなるように品種を配置した。‘Gabo’が、抵抗性が最も弱い、つまり赤かび病に最も感受性が高い品種である。

農薬を散布しなかった場合には、赤かび病に抵抗性の‘延岡坊主コムギ’や‘蘇麦3号’においては、DONやNIVの産生量が少なく、赤かび病に罹病性の‘Gabo’ではDONおよびNIVの産生量が高い結果を得た。しかし、この図の‘農林61号’と‘関東117号’においては、これらより赤かび病に罹病性の‘ゴガツコムギ’よりも多くDONやNIVが産生されていた。農薬を散布すると、一般的にはDONの産生量は減少する。品種別に見ると、‘関東119号’のようにDONもNIVも産生量が低いものがあることがわかった。このように、赤かび病に対して強い抵抗性品種では、DONやNIVの産生量が必ずしも少ないというのではないことがわ

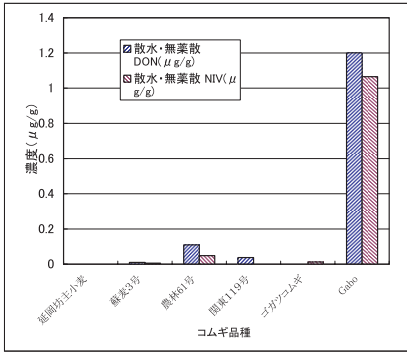


図2 農薬と散布しなかった場合のコムギの品種別トリコテセン系マイコトキシンの産生量

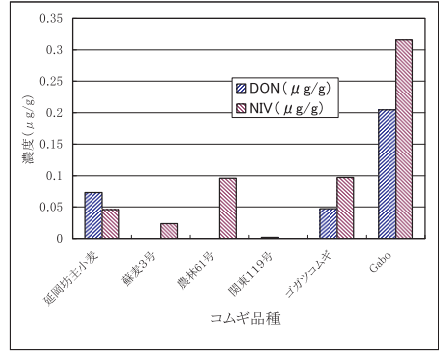


図3 農薬を散布した場合のコムギの品種別トリコテセン系マイコトキシンの産生量

かってきている。これらの研究は、現在継続中である。

2. 米のトリコテセン系マイコトキシンのによる汚染

米は、マイコトキシン汚染の少ない穀物である。ところが、1998年には、台風で倒伏し水に浸かった稲があり、この米は褐色に着色していた。この年は、ムギの赤かび病が大発生した年で、その際ムギがDONやNIVにより汚染されるという事態が発生した。そこで、その玄米のマイコトキシン汚染の有無を調べることにし、DONやNIVなどのトリコテセン系マイコトキシンの汚染を調べることにした。

まず、玄米についてトリコテセンの抽出の抽出を行い、分析した。抽出、精製は次のように行った。玄米を粉砕器で粉砕した後、25 gを精秤し、200 mLの75%アセトニトリル-水混合液で抽出した。ポリトロンで3分間振盪して、振盪器で30分間振盪して抽出を行った。抽出液を濾過し、濾液にヘキサンを加え振盪し脱脂を行った。アセトニトリル-水の抽出液に硫酸アンモニウムを添加し、除蛋白して、溶液を濃縮乾固した。そのままでは、揮発性が低く、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) にかげられないので、トリメチルシリル (TMS) 化して、GC-MSで分析した。そのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を、図4に示した。DON, 3-Ac-DON, Fus.-XそれにNIVをTMS化してGC-MSで分析した時のTICとDON, Fus.-XそれにNIVのマススペクトル (MS) を、図5に示した。図5のTICのDONなどが出てくる時間の位置のピークが、図4ではあまりはっきりしなかった。

そこで、抽出法を変えて検討した。5 gの玄米サンプルを40 mLの84%アセトニトリル-水混合液で抽出した。抽出液を遠心し、上清液を市販のRomer社製の

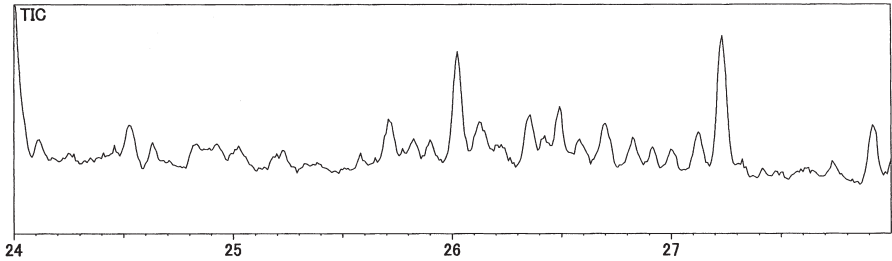


図4 倒伏し浸水した籾サンプルNo.2より得た玄米からの抽出物を、フロリジルカラムを使用して精製した濃縮物を、TMS化して、GC-MSで分析した際のTIC

MultiSep#227カラムにかけ、分画液を濃縮し、TMS化した。そのTMS化物を、GC-MSで分析した結果を、図6に示した。図4のTICに比べ、ベースラインが安定している。また、図5のTICと比較すると、Peak 1はDONの位置に、Peak 2はFus.-Xの位置に、またPeak 3はNIVの位置に相当した。また、各々のMSを比較すると、Peak 1はDONと、Peak 2はFus.-Xと、Peak 3はNIVのマスクロマトグラムとほぼ同じであり、各々のピークはそれぞれに該当した。これらの結果から、台風で被害に遭い、倒伏し水に浸かった籾から得られた玄米は、DON、Fus.-XそれにNIVに汚染されていたことが明らかとなった。米から、DONおよびNIVが検出されることは、以前から知られていたが、Fus.-Xが検出されたことは、世界で初めての知見となった。

その濃度を、表7に示した。No.2のサンプルは、DONが2.94 ppmであり、コムギでの暫定基準値1.1 ppmを超えていた。また、Fus.-Xの毒性は、DONとほぼ同程度、NIVの毒性は、DONの約10倍とすれば、それなりに大きな値であった。これらの結果は、農林水産省に報告した。農林水産省の適切な処置がなされたので、農林水産省の指導研究機関としての役割を演じることができたと、喜んでいいる。また、これらの結果も元となり、最近、農林水産省のプロジェクトで、コメのトリコテセン系マイコトキシンの汚染実態解明や汚染防止の研究が、九州沖縄農業研究センターの中島隆上席研究官を中心にして、進められている。

3. 8-デオキシトリコテシン

次に、8-デオキシトリコテシン (8-deoxy-trichotheclin) についてみてみよう。フランスの堆肥から分離された不完全菌*S. roseum*のタイプ由来株を培養すると、トリコテセン系マイコトキシンを産生することが知られていた。桃色かび立枯病を引き起こす原因菌として、岡田ら⁸⁾は長野県のエノキタケ(*F. velutipes*)から数株のカビを分離し、*S. roseum*と再同定し、理化学研究所のバイオリソー

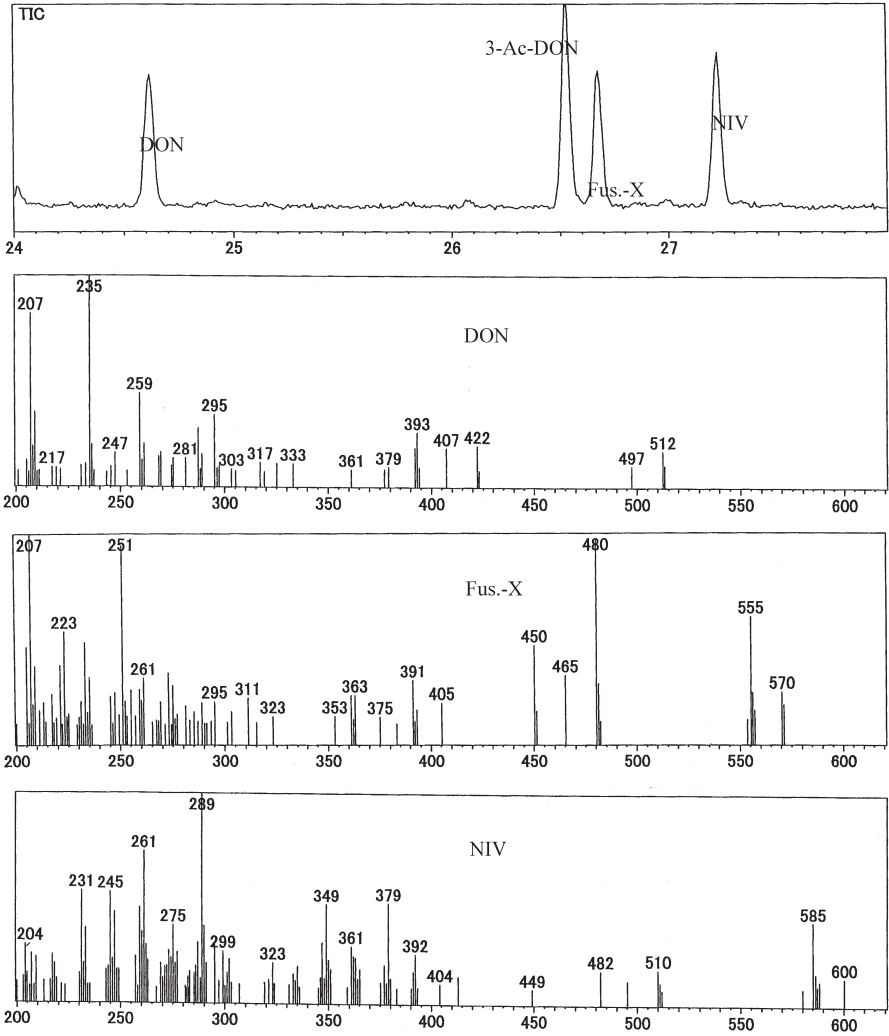


図5 DON, 3 Ac-DONおよびNIVの標準品をTMS化してGC-MSで分析した場合のTICと各々のMS

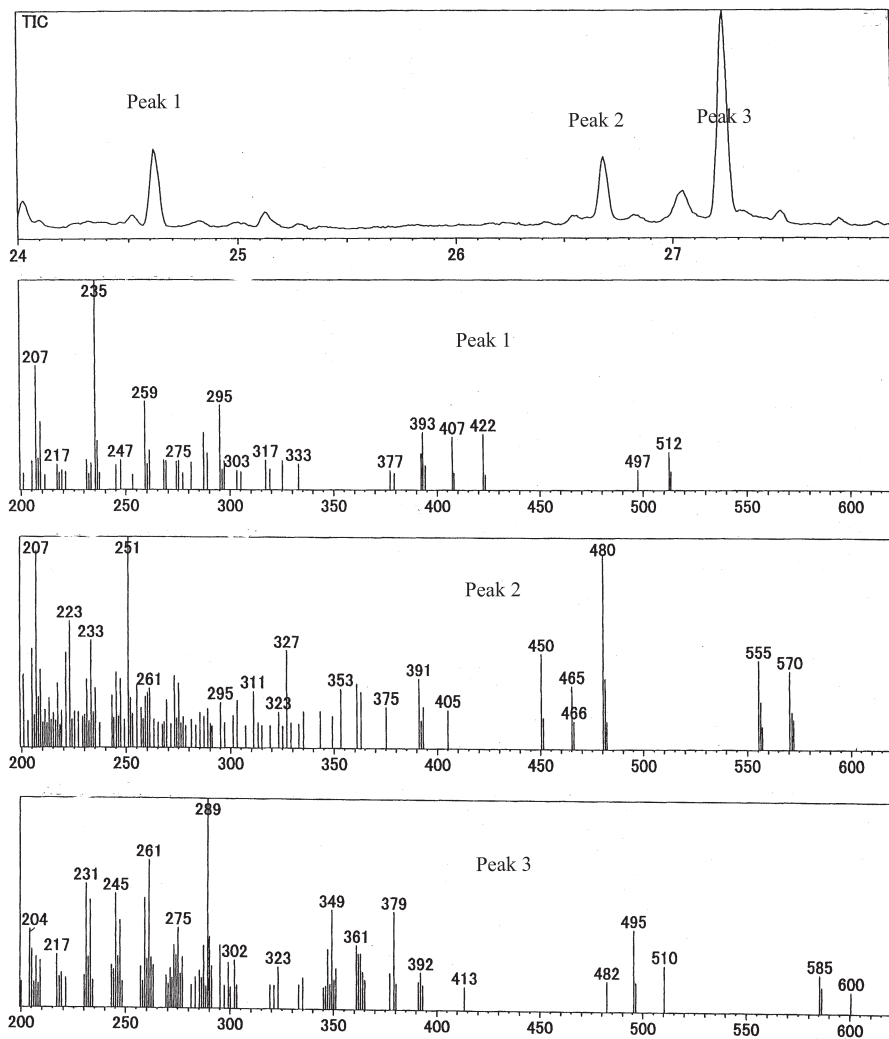


図 6 倒伏し浸水した籾サンプルNo. 2 より得た玄米からの抽出物を, MultiSep#227 カラムで精製し, TMS化してGC-MSで分析した場合のTICと, Peak 1, Peak 2 それに Peak 3のMS

表7 倒伏し浸水した籾よりの玄米中のトリコテセン系マイコトキシンの自然汚染

玄米サンプル	DON(ppm)	Fus.-X(ppm)	NIV(ppm)
No.1	0.119	—	0.197
No.2	2.94	1.89	2.23

スセンターに保管している。我々は、これら日本産の*S. roseum*がトリコテセン系マイコトキシンを産生するか否かを調べるために、分離菌株を米培地で培養し、マイコトキシンの分析を行った⁹⁾。EIモード及びCIモードのGC-MSで8-deoxy-trichothecinを分析した。図7に、8-deoxy-trichothecinをTMS化して、EIモードでのGC-MSで分析した場合のMSとTICを示した。図8に、*S. roseum* JCM 8965を培養し、抽出精製物をTMS化して、EIモードでのGC-MSで分析した場合のMSとTICを示した。図7のTICの7.13分でのMSと、図8のTICの7.15分でのMSは、一致し、両者は同じであることが明らかとなった。図9に、8-deoxy-trichothecinのイソブタンを使用したCIモードでのGC-MSでのMS、TIC、それに質量+1(M+1)である319のシングルイオンモニタークロマトグラム(SIMC)を示した。図10に、*S. roseum* JCM 8965を培養し、抽出精製物をTMS化して、CIモードでのGC-MSで分析した場合のMSとTICおよびM+1である319のSIMを示した。図9の7.27~7.30のMSと図10の7.26~7.29のMSはほぼ一致し、両者は同じであることが明らかとなった。以上の結果から、*S. roseum* JCM 8965は8-deoxy-trichothecinを、産生していることがわかった。

赤かび病罹病のムギから検出されるトリコテセン系マイコトキシンであるDON、3-Ac-DON、Fus.-XそれにNIVの産生についても調べたが、これらのマイコトキシンは検出されなかった。

これらの結果は、県の研究者や生産者に伝え、カビの感染を防ぐよう指導していただいた。現在は、このような被害はなくなったものと思われる。

キノコに感染したカビ*S. roseum*が、トリコテセンを産生することはおもしろい結果であった。今後もこのような実験を行い、食品の安全性を高める研究を行う必要がある。

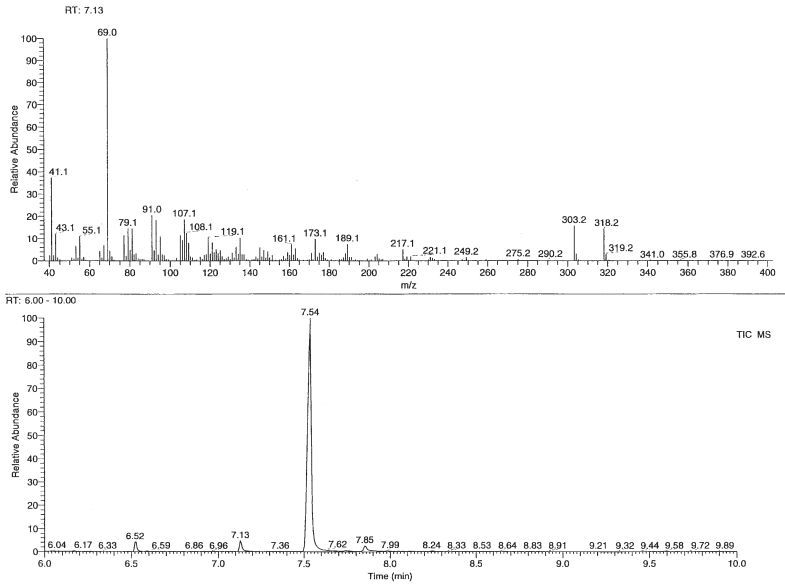


図 7 8-Deoxy-trichothecinをTMS化してGC-MSで分析した場合のEIでのMSとTIC

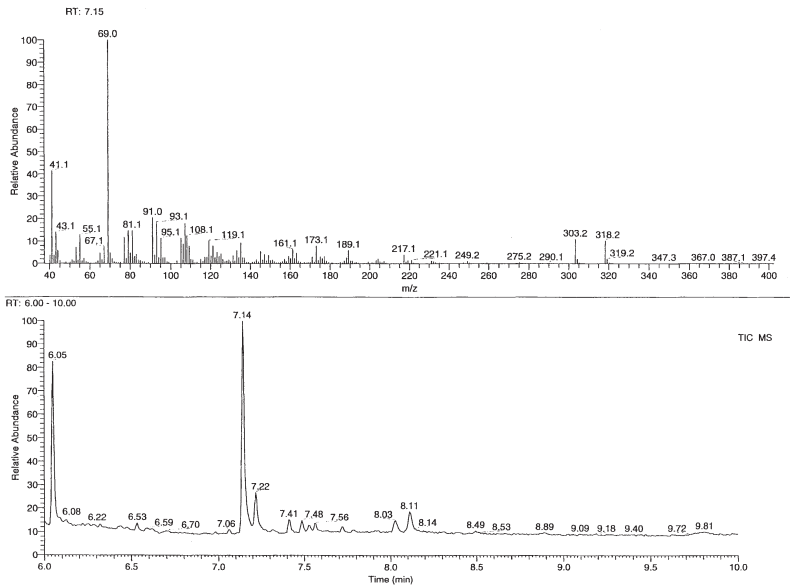


図 8 *S. roseum* JCM 8965の培養抽出精製物をTMS化してGC-MSで分析した場合のEIでのMSとTIC

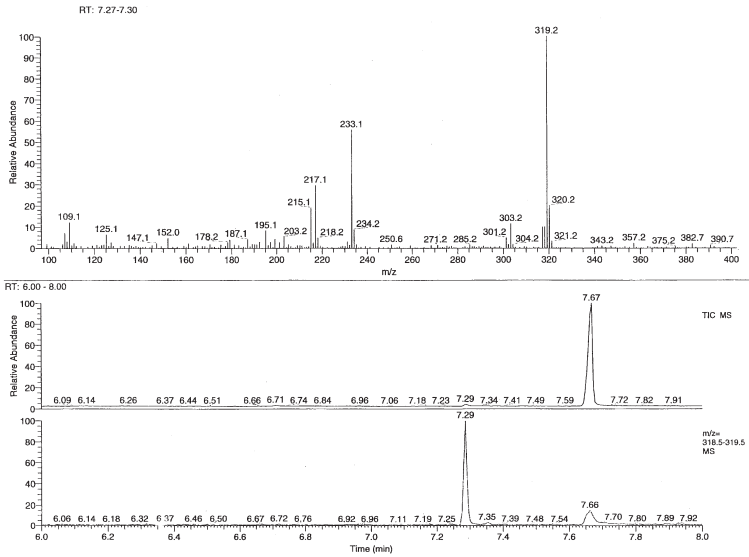


図9 8-Deoxy-trichothecinをTMS化してGC-MSで分析した場合のisobutaneによるCIでのMS, TICそれに319(M+1)のSIMC

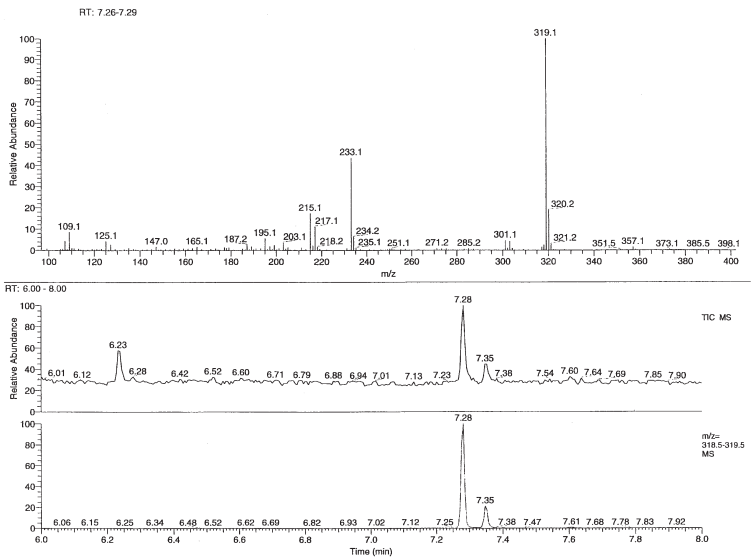


図10 *S. roseum* JCM 8965の培養抽出精製物をTMS化してGC-MSで分析した場合のisobutaneによるCIでのMS, TICそれに319(M+1)のSIMC

4. おわりに

ムギ類のマイコトキシンを測定しながら、植物病理学者の齊藤初雄氏らと共同研究を進める中で、マイコトキシン産生に抵抗性の品種の選抜、農薬の効果的散布などをはかりながら、ムギ類のトリコテセン系マイコトキシン汚染防除の研究をこれからも進めていくつもりである。その他の農産物も、カビの感染やマイコトキシンの汚染を調べながら、安全性を高める研究を行っていくつもりである。

謝辞

表1は神戸市環境保健研究所の田中敏嗣先生から、表2は、香川大学農学部教授の芳澤水実先生からそれぞれ転載を許可していただいた。両先生に深く感謝する。

(流通安全部 微生物制御研究室 田中 健治)

※ ムギ類の表記について

ムギの精麦に関しては、精麦の前の状態のムギを、オオムギおよびハダカムギについては「玄麦」が、コムギについては「原麦」が用いられている。そこで、本文および表中にはそのように記述した。

参考文献

- 1) Tanaka, T. and Sugiura, Y., Levels and pattern of contamination with trichothecenes in cereal grains and their risk assessment. *Mycotoxins*, **53**, 119-121(2003).
- 2) Yoshizawa, T., Geographic difference in trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley. *Bull. Inst. Compr. Agr. Sci, Kinki Univ.*, **5**, 23-30(1997).
- 3) Chelkowski, J., Trichothecenes(1-48), In "*Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity,"ed. J. Chelkowski, Elsevier, pp.13-24(1989).
- 4) 日ノ下文彦. トリコテセンの毒性影響としての腎障害, *Mycotoxins*, **53**, 123-127 (2003).
- 5) Tanaka, K., Hara, N. Goto, T. and Manabe, M., Reduction of mycotoxins contamination by processing grain. Proc. Int. Symp. Mycotoxicology '99-Mycotoxin contamination, Health risk and Prevention Project, eds., Kumagai, S. *et al.*, Keibundo Matsumoto Printing Co., Inc., Tokyo, pp. 95-100(1999).
- 6) 田中健治, 佐藤 剛, 齊藤初雄, 農薬を散布した場合のトリコテセン系マイコトキシンの産生性, 日植病報, **69**, 282-283(2003).
- 7) Tanaka, K., Kobayashi, H., Nagata, T. and Manabe, M., Natural

- occurrence of trichothecenes on lodged and water-damaged domestic rice in Japan. 食衛誌, **45**, 63-66(2004).
- 8) Okada, G., Takematsu, A., Sugita, T., Seifert, K.A., Yamanaka, K.: Proceedings of the 6th International Symposium of the Mycological Society of Japan-'98 Japan-UK International symposium, p.66(1998).
- 9) Tanaka, K., Plattner, R.D., Yamagishi, R., Minamisawa, M., Manabe, M., Kawasugi, S., Gareis, M., and Okada, G., 8-Deoxy-trichothecin production by *Spicellum roseum* isolated from a cultivated mushroom in Japan. *Mycotoxins*, **51**, 71-77 (2001).

微生物を利用したアフラトキシンの制御技術

1. はじめに

カビが生産する物質の中には人や動物の健康に有害な影響を与えるものがあり、これらの物質はカビ毒（マイコトキシン）と呼ばれている。現在まで300種以上の物質がマイコトキシンとして報告されてきている。中でも、汚染や障害の深刻さから実際に農産物汚染で問題になっているものとして、アスペルギルス属カビが生産するアフラトキシンB₁、オクラトキシンA、フザリウム属のカビが生産するデオキシニバレノール、ゼアラレノン、T2トキシン、フモニシンB₁などが挙げられる。穀物のマイコトキシン汚染は、家畜では豚肉や鶏肉の生産量の減少、ミルクや卵生産の減少、病気の発生、生殖率の低減等を引き起こし、世界では人における事故も報告されている。また先進国は、マイコトキシン汚染調査や汚染農産物の処理に莫大な費用を費やしており、マイコトキシンは世界経済においても深刻な問題となっている。

マイコトキシンによって生じる疾病はマイコトキシコーシス（カビ毒症）と呼ばれ、汚染食糧を摂取することでおこる。人の場合、汚染穀物を直接食べることによる場合と、汚染家畜の内臓や乳に残留するマイコトキシンを摂取する場合が考えられる。多種多様なマイコトキシンは生体内での代謝の違いにより標的臓器が異なり、症状も異なる。たとえば、アフラトキシンの標的臓器は肝臓で、急性毒性として肝細胞壊死がおこり、慢性毒性として肝臓がんを生じる。オクラトキシンは腎臓障害を生じ、発がん性も有することが示唆されている。同様に馬科の脳炎症や豚の肺浮腫症の原因物質であるフモニシンは、ラットに対して肝発がん性や発がん促進活性を示すことが報告されている。デオキシニバレノールは嘔吐、下痢、炎症などの胃腸障害を引き起こし、ゼアラレノンはエストロゲン類似物質で、豚の不妊や流産の原因物質である。一方、これらのマイコトキシンを複数、少量ずつ、長期にわたって継続して摂取する場合、健康にどのような影響を及ぼすかについては良く分かっていない¹⁾。

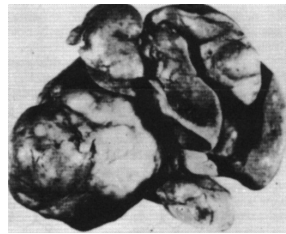
2. アフラトキシンについて

アフラトキシン(AF)は主として*Aspergillus flavus*と*Aspergillus parasiticus*に属するカビのうち一部のカビが生産するマイコトキシンである。極めて強力な発がん性と急性毒性を有し、アフラトキシンB₁は自然界で最も発がん性の高い物質として恐れられている²⁾。図1に示すように、アフラトキシンB₁は、他の発がん物質に比べても桁違いに少ない量で動物にがんを作らせることができる(図1)。また、「がんにならないための12か条」(国立がんセンター)(図2)で、9番目に「カビの生えたものに注意」という項目があるが、これはアフラトキシン摂取

典型的な発がん物質の強さ

アフラトキシンB ₁	1 μg
アセチルフルオレン	62 μg
3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン	86 μg
ジメチルニトロソアミン	300 μg

(毎日与えて半分の動物にガンが出来る量、
体重1kgあたり (杉村隆、1982))



AF投与によるラットの肝臓癌

図 1 発がん物質としてのアフラトキシン

アフラトキシンB₁は自然界でもっとも強力な発がん物質であり、肝臓がんを生じる。

1. バランスのとれた栄養を取る。
2. 毎日、変化のある食生活を。
3. 食べすぎを避け、脂肪は控えめに。
4. お酒はほどほどに。
5. タバコを少なくする。
6. 適量のビタミンと、繊維質のものを多くとる。
7. 塩辛いものは少なめに、熱いものは冷ましてから。
8. 焦げた部分は避ける。
9. カビの生えたものに注意。
10. 日光に当たり過ぎない。
11. 適度にスポーツをする。
12. 体を清潔に。

図 2 がん予防12か条 (国立がんセンター)

「9. カビの生えたものに注意」の項目は主にアフラトキシンを指す。

を指しているものである。先進国においては、穀物のアフラトキシン汚染については規制値が決められており、それに従って、厳重な検査が行われている。

アフラトキシン生産カビは熱帯・亜熱帯地域の土壌菌として常在し、この地域で収穫される穀物は常に汚染の危険にさらされている。また、穀物は世界で貿易されるため、アフラトキシン汚染は世界的に非常に深刻な問題となっており、さらに、地球の温暖化でアフラトキシン生産カビの分布が広がる可能性は大いにある。アメリカでは干ばつが起これると大規模な汚染が報告されることがある。日本の本州以北の温帯地域ではアフラトキシン生産カビは検出されないが、日本は食用・飼料用穀物の多くを輸入に頼っているため、輸入穀物は厳重な検査が行われている。一方、ステリグマトシスチンはアフラトキシンの前駆体であり、アフラトキシンよりは弱いが、やはり強力な毒性と発がん性を有している。ステリグマ

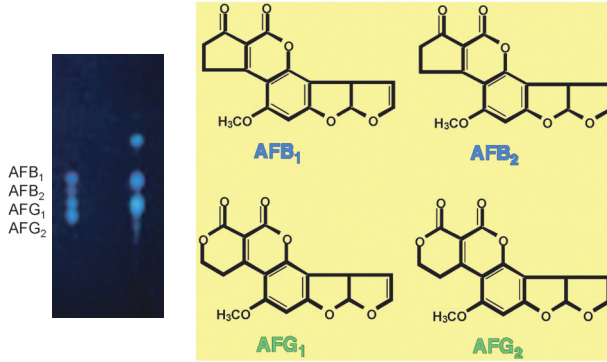


図3 カビが生産する主要なアフラトキシンの構造

アフラトキシンを生産するカビは主として *Aspergillus flavus* と *A. parasiticus* に属する一部のカビである。アフラトキシニン B₁ (AFB₁; アフラトキシニン B₁) と AFB₂ はブルーの蛍光を示し、AFG₁ と AFG₂ はグリーン色の蛍光を示す。

トシスチン生産菌は、日本にも常在しているため、アフラトキシニン汚染に対する防御法の開発は日本におけるステリグマトシスチン汚染防御の観点からも重要で緊急性の高い課題である。

アフラトキシニンには多種の誘導体が知られており、カビによって生産される主要なアフラトキシンはアフラトキシニン B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂) である (図3)。この中で AFB₁ は、カビが最も多量に作り、また、最も毒性及び発がん性が強いアフラトキシニンであるため、AFB₁ の穀物汚染が最も重要である。これら以外に、生体内で AFB₁ が代謝されて生じる AFQ₁ や AFP₁、アフラトキシニン汚染飼料を摂取した家畜の乳に検出される AFM₁ や AFM₂ 等、種々の誘導体が存在する。

アフラトキシニンが発がん性を獲得するには、肝臓の種々のチトクローム P450 モノオキシゲナーゼによって代謝され活性化されることが必要である。この活性化アフラトキシニンが DNA や RNA、またはたんぱく質に結合し、毒性や発がん性そして変異原性等を生じる²⁾。DNA のグアニン残基に結合することが発がん性に関連し、アフラトキシニンによるがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の変異が発がんを引き起こすと報告されている。それに対して、体内には摂取したアフラトキシニンを無毒化する機構も存在し、アフラトキシニン活性誘導体が生体内のグルタチオンや硫酸塩等と反応し高親水性物質に変換されて排泄される。

3. アフラトキシニンの汚染防御法について

カビは自然界に広く分布し、さらにマイコトキシンの多くは極めて安定な物質

であるため、マイコトキシン汚染を防御することは非常に困難である。アフラトキシン汚染の防御法に関する研究は世界で長年精力的に推進されてきている。しかし、汚染作物が安価なとうもろこしや綿花、ナッツ類等であるため、コストの面から現実には利用できない手段も多い。このため、未だ実用に耐えうるような安価で効果的な防御法は得られていない。そこで、汚染された穀物は基本的に廃棄処分されている。現在、世界で収穫される穀物の約4分の1が、カビが原因で廃棄されていると言われているが、アフラトキシン汚染によるものが多くを占めていると予想される。

アフラトキシン問題を解決する最も効果的な方法は、穀物のアフラトキシン汚染を防御することである。収穫した作物を迅速に洗浄・乾燥し、良い環境で保存することでカビの生育を制御することも有効である。収穫時期をずらしたり、鳥や昆虫による作物の障害を避けて、作物へのカビ感染の機会を減らすこともできる。近年、害虫抵抗性遺伝子組換えとうもろこしが米国で開発され、これらのアフラトキシン汚染は顕著に低いことが報告されている。害虫がつかず傷を作らないためカビ感染のチャンスが減ったためと予想される。また、米国を中心にマイコトキシン生産菌抵抗性の組換え農作物の開発も行われており、遺伝子組み換え作物の開発は将来のカビ毒対策の中心となるかもしれない。

一方、アフラトキシンに汚染された農作物を無毒化する研究も行われているが、アフラトキシンは他の多くのマイコトキシンと同様に、調理で用いる温度では分解しない安定な物質である。オゾンや塩素、アンモニア、重亜硫酸塩などの処理で無毒化する試みが報告されているが、これらの処理による農産物の品質低下やコストの面など多くの問題点が指摘されている。また、アフラトキシン等を吸着する添加剤を飼料に添加して毒性を下げる方法も利用されているが、効果は限られている。

より直接的な方法としては農薬利用が考えられるが、現在のところ、アフラトキシン汚染を特異的に防御する農薬は得られていない。我々は、農薬の開発に繋がる基礎的知見を得るため、長年にわたってアフラトキシン生合成機構を研究してきた。さらに近年、アフラトキシン防御のための微生物利用を検討した。これについて、以下に詳述する。

4. アフラトキシン生合成機構とアフラトキシン生産阻害

4.1 アフラトキシン生合成経路

アフラトキシン生合成経路については関与する酵素反応のほとんどが明らかになってきている。アフラトキシンはAcetyl CoAから少なくとも18の酵素反応を経て合成される(図4)。関与する酵素は多様で、種々の酸化還元酵素、チトクロームP450モノオキシゲナーゼ、エステラーゼ、脱水酵素等が含まれる³⁾。中には膜酵素や可溶性酵素もあり、酵素の局在とアフラトキシン生産性の効率との関係

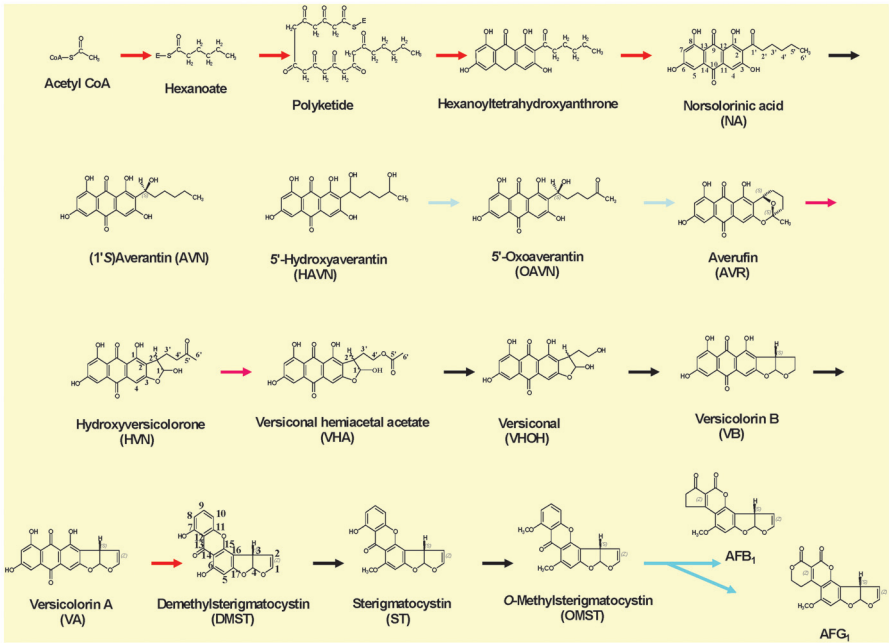


図 4 アフラトキシン合成経路
 細い黒線は可溶性酵素，赤の太線は膜酵素

を考える上で興味深い。

汚染防御を考える上で、合成経路の中でどこをターゲットに汚染防御を考えるかは重要な問題である。いずれの酵素もアフラトキシン生産阻害のターゲットになりうるが、種々の中間体は合成経路が進むほど毒性が高くなる。したがって、初期の反応がより良いターゲットと言える。また、種々の酵素遺伝子の破壊実験から、ある酵素遺伝子を完全に取り除いても完全には酵素活性がなくなる場合がある。たとえば、合成経路中versiconal hemiacetal acetateからversiconalの反応を触媒するエステラーゼは、遺伝子を完全に破壊しても酵素活性が10%ぐらい残る。これはアフラトキシン合成とは全く関係のない体内のエステラーゼ酵素が、アフラトキシンの代謝にも関与できることを示している⁴⁾。従って、このような反応段階をターゲットにしてもアフラトキシン生産を完全に阻害することはできないため、汚染防止のターゲットとしては適当ではない。それに対して、種々のチトクロームP450モノオキシゲナーゼは基質特異性が高く、遺伝子破壊により完全にアフラトキシン生産能が失われるため、阻害剤開発のための適当なターゲットといえる³⁾。

4.2 補酵素とアフラトキシン生産

アフラトキシン合成に関与する多くの酵素は、その活性に補酵素NADPHを必要とする。NADやS-アデノシルメチオニンを必要とする酵素もあり、これらの補酵素は、生体内でATPなど高エネルギー化合物を多量に利用して合成される³⁾。従って、アフラトキシン生産活性は補酵素供給に携わる種々の代謝によって間接的に制御されていると言える。この意味でこれらの代謝もアフラトキシン汚染防御のターゲットと考えることができるが、補酵素はカビの生育にも必要なため、その有効性には限界がある。

4.3 アフラトキシン遺伝子クラスターと制御

アフラトキシン生産に関連する遺伝子は、そのほとんどが染色体上の一ヶ所に局在し、その領域をアフラトキシン遺伝子クラスターと呼んでいる⁵⁾。アフラトキシン遺伝子クラスターの中には、少なくとも25の酵素遺伝子が存在し、多くの遺伝子の機能が解明されてきた。クラスターの中には酵素遺伝子の他に、制御遺伝子*aflR*（制御という意味のR）がある。アフラトキシン生産カビは種々の生育条件によってアフラトキシンを作ったり作らなかったりする（図5）。これは酵素遺伝子の発現が環境によって変化するためで、*aflR*遺伝子の発現によって制御

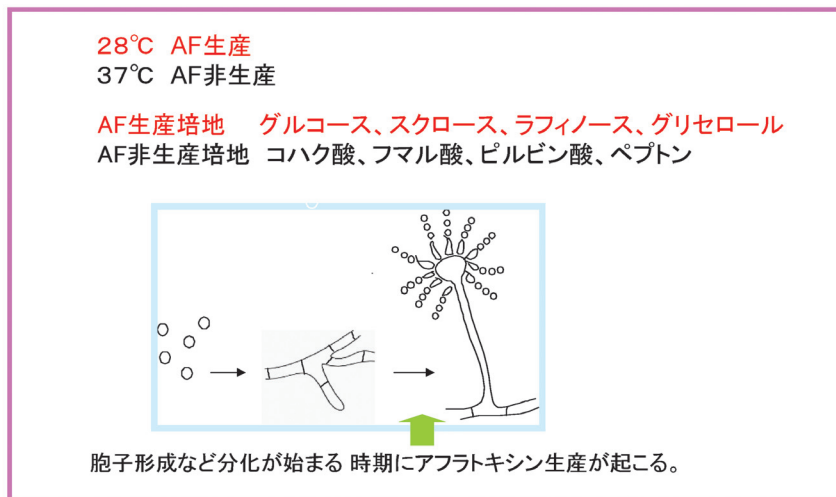


図5 アフラトキシン生産の特徴

カビは培養条件（温度、炭素源等）によってアフラトキシンを作ったり作らなかったりする。

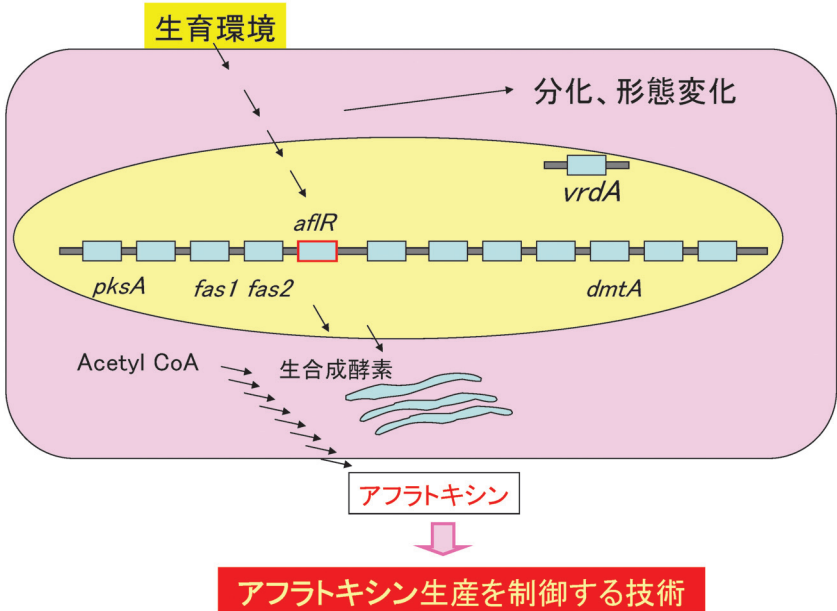


図6 アフラトキシン生産制御概念図

生育環境からアフラトキシン生産までのいずれの段階を阻害してもアフラトキシン汚染を防御することができる。

されている。つまり、アフラトキシン生産を誘導する環境（炭素源、温度等）下、その情報が細胞外から細胞内の核の*aflR*遺伝子に伝えられると*aflR*遺伝子が発現し、*AflR*蛋白質が生産される。*AflR*は各酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し、それによって各酵素遺伝子が一斉に発現する。こうしてアフラトキシン生産に関連するすべての酵素が合成され、アセチルCoAから多くの酵素反応を経てアフラトキシンが合成される（図6）。したがって、環境刺激から*aflR*遺伝子の発現までのいずれかの段階を特異的に阻害できれば、アフラトキシン生産を効果的に阻害できると考えられる。そして、汚染防御の強力な手段となると期待され、近年、このシグナル伝達の過程は多くの研究者によって活発に研究されている。しかし、その詳細が明らかになるまでにはまだしばらく時間がかかると思われる。

4.4 カビの生育

アフラトキシンはカビの二次代謝産物であり、その生産はカビの増殖時期より後に誘導される。カビの生育自体を阻害できればアフラトキシン生産は起こらない。従って、アフラトキシン汚染防御のために抗真菌剤を開発することは、アフ

ラトキシン汚染防御の一つの有効な方法である。しかし、水虫の薬など抗真菌剤の開発は長年、医学分野で行われてきているが、実用化できた抗真菌剤の数は限られている。従って、新規の抗真菌剤を発見することは困難が予想される。また、抗真菌剤の開発は、将来、抗生物質で見られるような耐性菌が出現する可能性がある。そこで我々は、アフラトキシン汚染防御法の開発を目的として、アフラトキシン生産を特異的に阻害する方法の開発に重点を置いて研究を進めてきた。

5. 微生物を利用したアフラトキシン生産防御法の開発

自然界に存在する種々の微生物は自然界の物質循環に大きく関与しており、その代謝能力は莫大なものがある。これまで自然界から多くの微生物が単離されてきているが、未だ自然界の微生物の99%は未知であるといわれている。一方、アフラトキシン生産に影響を与える微生物についても多くの報告例がある。しかし、阻害微生物が作るアフラトキシン生産阻害物質を精製し、構造決定まで行った例は放線菌が作るアフラスタチン⁶⁾以外知られていない。我々は、土壌など自然界に存在する未知の微生物から新たにアフラトキシン生産阻害菌を発見し、その微生物が作る阻害物質の構造を決定し、そしてその阻害物質をリード物質として構造改変することで、効果的なアフラトキシン生産阻害剤を得たいと考えている。そこで、われわれは微生物を利用した新たな汚染防御法の開発を目指し、微生物代謝産物の研究を進めた⁷⁾。

5.1 生産阻害菌のスクリーニング（簡便な検出法の開発）

自然界の莫大な数の微生物の中からアフラトキシン生産阻害菌を探し出すには、アフラトキシン生産性を簡便に検出できる方法が必要である。アフラトキシンは目に見えないが、紫外光を吸収し、鮮やかな青や緑の蛍光を発する。すでに我々はこのアフラトキシンが紫外光を吸収する性質を利用して、簡便な紫外線写真によるアフラトキシン生産菌の検出法を開発した⁸⁾。また、アフラトキシンの蛍光を利用して生産性の有無を判断する方法も得られている。

しかし、これらの方法には紫外線照射設備が必要であり、また、他の方法による結果の確認が必要であった。さらに、アフラトキシンは菌体外に分泌されるため、寒天培地では検出像のコントラストが悪いという問題があった。一方、アフラトキシンとは異なり、ほとんどすべてのアフラトキシン前駆体は菌体内に蓄積する。その前駆体の多くが黄色や赤の色をもつため、その増減を検出することは比較的容易である。そこで、以下のように赤色中間体であるノルゾロリン酸の菌体内での蓄積を指標に、微生物によるアフラトキシン生産阻害活性を検出した。

5.1.1 中間体の赤色の濃さを指標に検出する方法

ノルゾロリン酸(NA)は、アフラトキシン生合成経路の最初の色素性中間体で

アセチルCoA → NA → → → AF

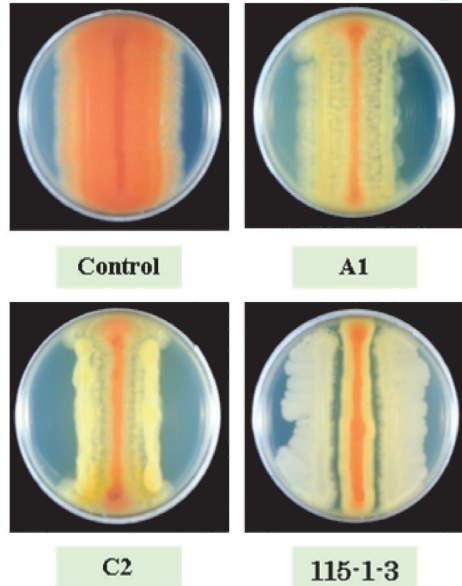
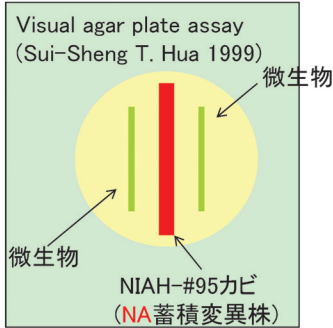


図7 アフラトキシン生産阻害菌のスクリーニング

ノルゾロリン酸 (NA, 赤色色素) 蓄積変異株と自然界から単離した微生物と一緒に培養し、蓄積変異株のノルゾロリン酸 (赤色色素) 生産の減少を色で判断した。また、変異株の生育に対する影響も一緒に調べることができた。矢印でアフラトキシン生産阻害微生物A1を指す。

あり、鮮やかな赤色をもつ。そのため、ノルゾロリン酸が蓄積したカビ集落を培地の裏側から見ると、鮮やかな赤色を示す。Huaらはアフラトキシンの代わりにノルゾロリン酸蓄積変異株を用いて、アフラトキシン生産阻害酵母のスクリーニングを行った⁹⁾。

そこで、我々はノルゾロリン酸蓄積変異株NIAH-95を紫外線照射によって作り、自然界に常在する菌、例えば土壌菌や植物表面の菌、また落下菌をこの変異株と近接して接種し、培養した (図7)⁷⁾。

スクリーニングには直径9 cmシャーレ中の寒天培地の中央に#95株を点で接種し、取り囲むように複数の菌を点で接種して培養後、カビ集落の色の变化を調べた。赤色素の生産を抑える菌が複数検出され、それらの阻害菌についてさらに図7のように線で培養し阻害効果を確認した。培地としてはアフラトキシン生産の誘導培地であるGY (2% グルコース, 0.5% 酵母エキス) 寒天培地を用い、28°Cで3日以上培養した。スクリーニングを3回以上繰り返して阻害微生物を純化し、

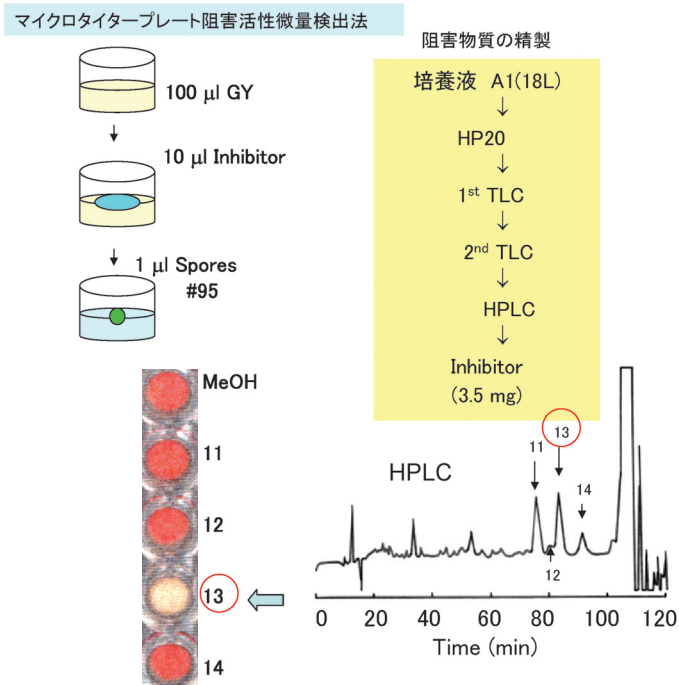


図 8 アフラトキシン生産阻害物質の微量検出法と精製

マイクロタイタープレートアッセイによって少量の阻害剤を用いて簡便にNA（ノルゾロリン酸）生産阻害活性を検出できた。HPLCで分析し、ピーク13が阻害物質であることがわかった。最終的に、18Lの培養液から3.5mgの阻害物質が得られた。

検討を進めた。ノルゾロリン酸の色を指標にするこの方法は、菌をカビと近接して培養するため、カビの生育への影響も同時に調べることができ、微生物間の相互作用に関連した多くの情報が得られた。

5.1.2 マイクロタイタープレートを利用した微量検出法

Huaらの方法は、アフラトキシン阻害菌を検出するのに大変優れた方法である。しかし、直径9 cmシャーレを用いるためシャーレあたり15ml以上の寒天培地が必要で、微量の阻害物質の検出には適していない。そこで、我々は阻害活性の微量検出法としてマイクロタイタープレートアッセイ法を開発した（図8）。96穴マイクロタイタープレートの各穴に0.1mlGY寒天培地（深さ4 mm）を入れ固化する。10 µl以下の阻害物質抽出液を培地の中心に添加し、阻害物質が培地内に拡散さ

せるためしばらく放置する。阻害物質を有機溶媒に溶かして用いる場合は、阻害物質を含む有機溶媒を添加後30分以上蓋を開けて放置する。これは、阻害物質を媒地中に拡散させるとともに、高濃度の有機溶媒がカビの生育を阻害しないように持ち込んだ有機溶媒を蒸発させるためである。その後、ノルゾロリン酸蓄積株 NIAH-95の孢子（1 μ l以下）を培地の中心に接種する。この方法では極めて培養規模が小さいため、接種する孢子数をそろえる必要はない。孢子接種後は、プレートの四隅に少量の粘土を丸めて置き、その上に蓋をして外科用テープでシールすることによって、蓋を浮かした状態で培養する。蓋を閉めて培養すると残存するメタノール蒸気によってカビの生育が阻害されることがあるためである。その後、プレートが乾燥しないようにぬらしたティッシュをいれたボックスにプレートを入れ、28℃で1～2日間培養する。マイクロタイタープレートを裏から観察すると、阻害がなかった穴はノルゾロリン酸の鮮やかな赤色を示すのに対して、阻害があった場合には菌糸の白っぽい色が見える。この方法によって、微量物質の阻害効果も簡便かつ確実に調べることができるようになった。さらに、96穴のマイクロタイタープレートを用いることで、たくさんの実験を一度に行うことが可能となった。

5.1.3 チップ培養法を利用したアフラトキシン生産阻害検出法

ノルゾロリン酸の色を指標に阻害菌や阻害物質を検出した後には、実際にそ

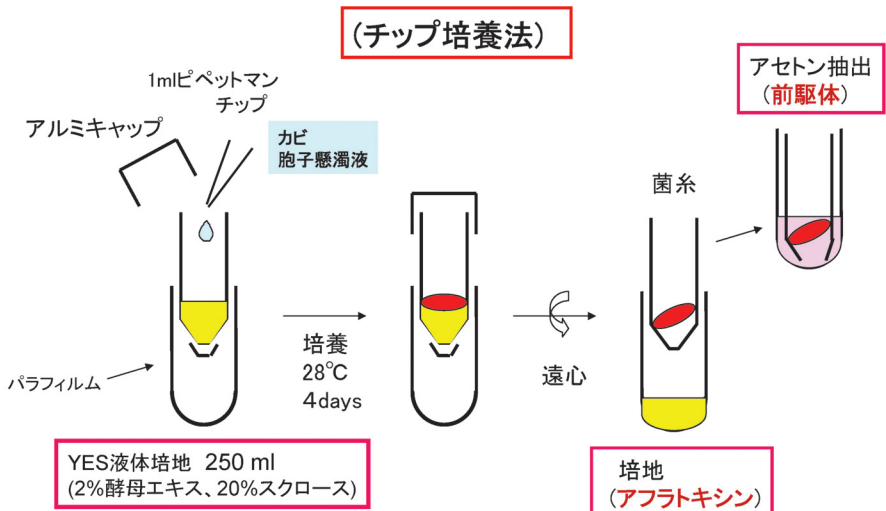


図9 チップ培養法

れらがアフラトキシン生産を阻害することを確認する必要がある。そこで、アフラトキシン生産への阻害効果を定量的に検出するためチップ培養法を用いた(図9)¹⁰⁾。この方法では、1mlのピペットマンのチップをカビの培養器として用いる。チップの先に石英ウールを少量詰め、重量を測る。その後、チップの尾部がチューブの口に丁度引っかかるサイズに作ったガラス試験管にセットし、その後アルミキャップで蓋をする。試験管ラックごと全体を滅菌し、その後チップの先端を2重のパラフィルムでシールする。そして、液体YES培地(200 μ lまたは250 μ l, 20%蔗糖, 2%酵母エキス)をチップに加える。阻害物質の効果を見る場合は、この培地に阻害物質を添加する。その後、アフラトキシン生産カビ *Aspergillus parasiticus* (SYS-4) NRRL2999の胞子液を5 μ l(胞子数の調整は不要)を接種し、28 $^{\circ}$ Cで4日間培養した。

カビの生育には空気が必要なため、培地の表面に菌糸の塊ができる。その後、先端のパラフィルムを除いて軽く遠心して培地と菌体を分ける。菌体はチップ中に残るので、チップ全体の重さを測り、培養前に測定した重量を差し引くことで菌体重量を計算する。これによって、阻害物質のカビの生育への影響がわかる。

一方、アフラトキシンは菌体外に出るため、遠心後、試験管に回収された培地を少量直接シリカゲル薄層クロマトグラフィープレートにスポットして乾燥後、展開液で展開する。生産量を正確に知りたい場合には培地を等量のクロロホルムで抽出し、抽出液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する。一方、アフラトキシン前駆体は菌体内に蓄積するため、前駆体を調べたい時には、チップ中の菌体のすぐ下の部分をはさみで切り、菌体が入ったチップを新しいガラス試験管に入れて、さらに菌体が浸かるよう0.8mlのアセトンを入れ抽出する。抽出液を濃縮後、薄層クロマトグラフィーやHPLCで分析することによって、阻害物質のアフラトキシン生産への効果を簡便に、そして定量的に調べることができた。

5.2 アフラトキシン生産阻害菌の単離

土壤など自然界には莫大な数の菌が存在すると予想されるが、培養条件は菌によって異なり、実際に培養できる菌は極めてわずかである。我々は最初の試みとして、最も培養が容易な好気性菌を対象に、ノルゾロリン酸生産阻害菌を探した⁷⁾。土壤や葉などを生理食塩水で洗浄し、洗浄液を寒天培地上に広げ、28 $^{\circ}$ Cで培養した。培養後、種々の菌を集落の形態の違いに基づいて選抜した。そして寒天シャーレ上でノルゾロリン酸蓄積NIAH-95株と1.5cm離して対峙培養した。その後、NIAH-95株の菌糸の赤色の濃淡を指標に、阻害効果を観察した(図7)。土壤菌の中にはカビの赤色を顕著に減少させる菌がいて、菌の純化を繰り返しながらノルゾロリン酸蓄積カビへの影響を確認することによって、最終的に約10種の阻害微生物が得られた。その中で最も顕著なノルゾロリン酸生産阻害活性を示した菌(A1と仮称)について、以下のように阻害物質の単離を試みた。

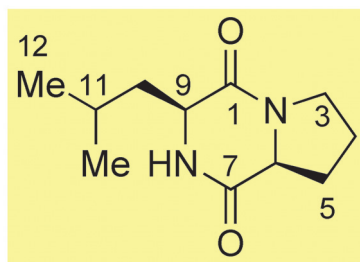
5.3 阻害菌の同定と性質検討

菌を培養し顕微鏡で形態を調べ、さらに生化学的性質を検討した。その結果、A1はグラム陰性の細菌で、カタラーゼ活性陽性である等の種々の性質を示した。さらに、16S rRNA遺伝子配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、A1菌が*Achromobacter xylosoxidans*であることがわかった⁷⁾。さらに阻害効果がA1菌に特有の性質なのか、この細菌種に共通して見られるものかを確認するため、同種の菌を4種類、理研の微生物バンクから取り寄せノルゾロリン酸生産阻害効果を調べた。その結果、4種すべてがA1と同様にノルゾロリン酸生産阻害活性を示したため、アフラトキシン生産阻害活性はこの種が共通に有する性質であることが明らかとなった。

さらに、阻害活性は菌体を除いた培地でも検出でき、つまり阻害物質は菌体外に分泌されるものであることが確認された。また、阻害物質の生産条件を調べるため種々の培地で培養後、培地の阻害活性を比較した。阻害活性はいずれの培地でも検出でき、最も単純なGY培地で静置培養した場合にも生成した。培養温度は20℃から37℃で顕著な阻害活性が見られ、阻害活性は強酸処理でも強アルカリ処理でも安定に維持された。さらにオートクレーブ処理でも失活しないことから、阻害物質はたんぱく質ではなく、安定な有機化合物であることが示唆された。

5.4 阻害物質の精製

阻害物質の構造を決めるためには数mg以上の精製阻害物質が必要である。そこで、*A. xylosoxidans* A1を18Lの培地で培養し、得られた培地から種々のクロマトグラフィーを用いて阻害物質を精製した(図8)⁷⁾。18Lの培養液を我々が操作可能な量に減らすためにはDiaion HP20カラム(6 x20cm)の利用が有効であった。18Lの培養液をDiaion HP20カラムにのせ、カラム溶出液の阻害活性をマイクロタイタープレートアッセイで調べると、溶出液には阻害活性が検出されず、従って阻害物質がカラムに結合したことが確認できた。カラムを大量の水で洗った後、カラムに50%、60%、80%、100%メタノール水溶液を段階的に加え、それぞれの液で出て来る溶出液について活性を調べた。各溶出液を濃縮し、少量のメタノールに溶かしてマイクロタイタープレートアッセイで阻害活性を調べた結果、60%から80%メタノール画分で阻害物質が溶出した。この画分を濃縮後、シリカゲル薄層クロマトグラフィープレートに線状にスポットして展開した。乾燥後薄層クロマトグラフィープレートを上から下まで11の領域に分け、それぞれの画分のシリカゲルをかきとって小さなカラムに詰めて、結合した物質を有機溶媒で抽出した。それぞれの画分の阻害活性をマイクロタイタープレートアッセイで調べ、活性を示した画分を再度、薄層クロマトグラフィーで精製した。こうして得られた活性画分を、更に高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。溶出液をピー



Cyclo(L-leucyl-L-prolyl)

図10 *Achromobacter xylosoxidans*が生産した阻害物質cyclo(L-Leu-L-Pro)の構造

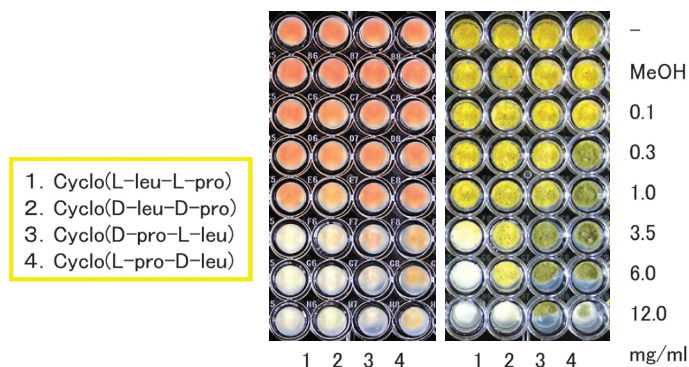


図11 cyclo(L-Leu-L-Pro)とその異性体のNA生産阻害効果(左)とカビの生育(右)に対する効果。

クパターンに基づいて分画し、濃縮乾固後、少量の有機溶媒に溶かして阻害活性をマイクロタイタープレートアッセイで調べた。その結果、阻害活性が一つの吸収ピークに一致して検出された。これは阻害物質が精製できたことを示し、これにより最終的に3.5mgの精製阻害物質が得られた。

5.5 阻害物質の構造決定とその作用

質量分析により阻害物質は210Daの分子量であり、 ^1H NMRや ^{13}C NMRの分析からは、阻害物質がロイシンとプロリンの二つのアミノ酸が環状に連結したcyclo(leucyl-prolyl)であることが確認できた。さらに旋光分散等の測定からcyclo(L-leucyl-L-prolyl)であることが明らかとなった (図10)⁷⁾。

種々の濃度のcyclo(L-leucyl-L-prolyl)を用いてマイクロタイタープレート

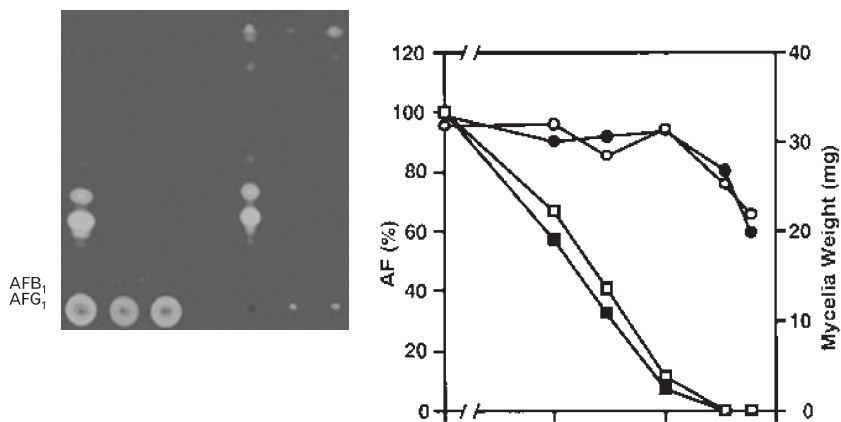


図12 cyclo(L-Leu-L-Pro)によるアフラトキシン生産阻害

チップ培養法で培地にcyclo(L-Leu-L-Pro)またはcyclo(D-Leu-D-Pro)を添加し、アフラトキシンの生産性への影響を調べた。チップ培養法では両方の異性体は同程度にアフラトキシン生産を阻害した。

アッセイを行なったところ、 1.0 mg ml^{-1} の濃度で50%の阻害活性を示した。また、cyclo(L-leucyl-L-prolyl)の立体異性体であるL-D、D-Lを合成し、D-D体は購入して、それぞれの異性体の阻害活性を比較すると、L-L体がかつとも強い効果を示した(図11)。さらに、異なるアミノ酸から構成された環状ジペプチドであるcyclo(L-Pro-L-Val)やcyclo(L-Leu-L-Gly)等を用いて阻害活性を調べると、いろいろな程度の阻害活性を示し、最終的に阻害にはロイシン等疎水性アミノ酸とプロリンの存在が必要であることが明らかとなった。この特徴を維持し構造改変していくことによって、より阻害活性の高い物質を開発できる可能性が示唆された。

5.6 アフラトキシン生産阻害

ノルゾロリン酸生産阻害物質がアフラトキシン生産阻害物質であることを確かめるために、cyclo(L-leucyl-L-prolyl)のアフラトキシン生産に対する影響をチップ培養法を用いて調べた(図12)。その結果、cyclo(L-Leu-L-Pro)はアフラトキシン生産阻害活性を示し、 0.2 mg ml^{-1} の低濃度でアフラトキシン生産を50%阻害した。一方、この濃度ではカビの生育は阻害されなかった。また、 6 mg ml^{-1} の高濃度ではアフラトキシン生産は完全に阻害され、この濃度ではカビの重量もわずかに減少した。このような高濃度における生育阻害は、多くの二次代謝阻害剤で見られることである。以上の結果から、cyclo(L-Leu-L-Pro)は新規のAF生産阻害物質であることが確認された。

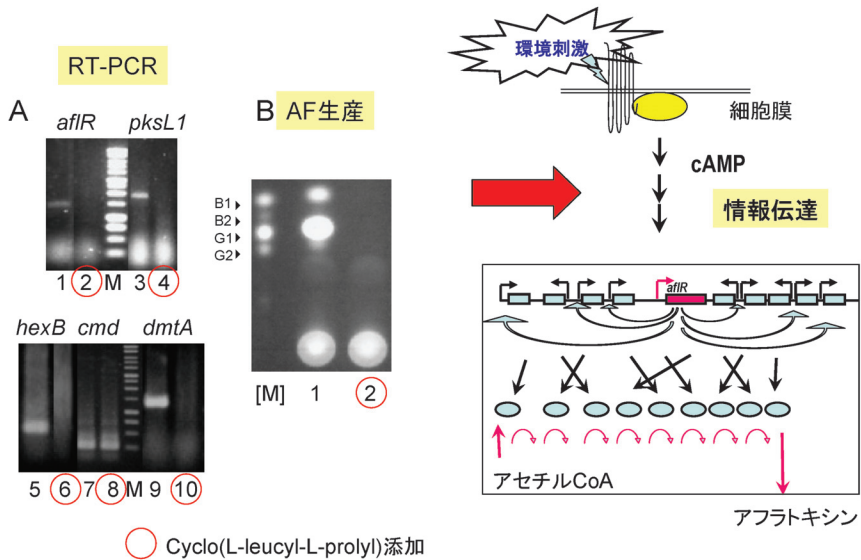


図13 アフラトキシン関連遺伝子の発現に対するCyclo(L-Leu-L-Pro)の影響

Cyclo(L-Leu-L-Pro)はアフラトキシン制御遺伝子*aflR*の発現を阻害し、その結果酵素遺伝子の発現も阻害する。A. RT-PCR. *aflR*, 制御遺伝子; *pksL1*, *hexB*, *dmtA*, 酵素遺伝子。 *cmd*, アフラトキシン非関連遺伝子。奇数レーン, 阻害剤非添加; 偶数レーン, 阻害剤添加。B. アフラトキシン生産の分析。右図, cyclo(L-Leu-L-Pro)は環境刺激から*aflR*発現までのいずれかの段階を阻害する。

5.7 アフラトキシン生産誘導過程における阻害物質の作用部位

次に、アフラトキシン生合成機構におけるcyclo(L-Leu-L-Pro)の阻害機構を調べた。cyclo(L-Leu-L-Pro)はノルゾロリン酸の蓄積を阻害することから、阻害部位はノルゾロリン酸生産より前の段階にある。環境刺激からの情報伝達、制御遺伝子*aflR*の発現、酵素遺伝子の発現制御等いろいろな段階が予想されたが、まずアフラトキシン生産関連遺伝子の発現に対するcyclo(L-Leu-L-Pro)の阻害効果をRT-PCRを用いて調べた(図13)。cyclo(L-Leu-L-Pro)を含まない培地と含む培地でアフラトキシン生産カビ*Aspergillus parasiticus*を培養後、菌体からRNAを調製し、3種の酵素遺伝子*pksL1*, *hexB*, *dmtA*の発現と制御遺伝子*aflR*の発現を調べた。その結果、すべての遺伝子の発現がcyclo(L-Leu-L-Pro)の添加によって阻害された⁷⁾。cyclo(L-Leu-L-Pro)は*aflR*の発現も抑制することから、cyclo(L-Leu-L-Pro)が*aflR*発現よりもっと前の段階を阻害することが示唆された。先に述べたように、阻害効果がcyclo(L-Leu-L-Pro)の疎水性アミノ酸とプロリンに依存していることから、この物質の細胞膜へ作用が阻害効果に効いている可能性がある。この物質

1. 有毒物質の簡易検出法の開発
(スクリーニング法、定性法、定量法)
2. 自然界から微生物の採集
3. スクリーニング
4. 阻害微生物の同定(リボゾームRNA遺伝子配列)
5. 大量培養
6. 精製
7. 構造決定(リード物質)
8. 作用機構の解明
9. 構造改変による阻害効果の増強

図14 微生物代謝産物から有害物質生産制御物質探索及び実用化へ

が、いまだ解明されていない情報伝達機構の解析に有用である可能性も示唆された。

6. 微生物を利用した有害二次代謝阻害技術の可能性

アフラトキシン生産菌が常在する地域においても土壤中のアフラトキシン生産菌のポピュレーションは一定レベルに抑えられている。おそらくは拮抗微生物が共存しているものと予想される。従って、アフラトキシン生産阻害剤を微生物代謝産物から発見する研究は大いに発展する可能性がある。また、これまで、アフラトキシン生産阻害活性を簡便かつ信頼性高く検出できる微量検出法がなかったため、アフラトキシン生産阻害物質の検索は不十分なままであった。本研究で、ノルゾロリン酸生産阻害活性がノルゾロリン酸の赤色の濃淡で簡便かつ確実に検出できることを確認し、さらに阻害物質の微量分析にも利用できるよう改良を加えた。実際にこれら方法を用いて、自然界の微生物から新規のアフラトキシン生産阻害物質を精製し構造を決めることができた。さらに、作用機構に関する情報も得られ、ここで記した研究方法は、多くの阻害物質を自然界から見つけるのに非常に有効であることが確認できた(図14)。

従って、ここで述べた方法をもちいて、異なる国や地域の環境(土壌や植物表面等)に存在するできるだけ多くの微生物(細菌,糸状菌,他)のスクリーニングを大規模に行い、種々の阻害物質の構造を検討していけば、近い将来アフラトキシン汚染防御に有用で実用化可能な農薬の開発に繋がると考えている。

7. おわりに

疫学的調査によれば、世界では、アフラトキシン汚染が原因で毎年25万人が死亡していると報告されている。また、昨年はアフリカにおいてアフラトキシンに汚染した穀物を食べて急性毒性により多くの人が死亡した。このようにアフラトキシンの問題は世界的に非常に深刻である。今後予想されている世界の人口増

加や地球温暖化は、アフラトキシン汚染穀物を廃棄することで食糧の安全性を確保する現在のやり方が長くは続かないことを意味している。アフラトキシン以外にも深刻なカビ毒が他にもあることは最初に述べたが、カビ毒の中でアフラトキシンはその強烈な毒性のために最も調査・研究が進んでいる。そのため、その研究や対策の方向性は他のカビ毒対策の基礎となっていくものと思われる（図15）。ニバレノールやデオキシニバレノール、パツリンやオクラトキシン等でも簡便な検出法の開発は必要である。これらカビ毒の防御に力を入れることは、自然環境を維持し農業産物を長く有効利用していくために、現代に生きる人間の重要な責務であり、この分野に多くの研究者が参画することを期待したい。

謝辞

本研究は鳥取大学農学部中島廣光教授の研究グループとの共同研究によるものである。本研究の一部は、日本学術振興会(JSPS)外国人特別研究員事業、国連大学—キリンフェローシップの補助によって推進された。

(生物機能開発部 細胞機能研究室 矢部希見子)

参考文献

1. Jelinek, C. F., A. E. Pohland, and G. E. Wood. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds--an update. *J Assoc Off Anal Chem* 72:223-30.
2. Massey, T. E., R. K. Stewart, J. M. Daniels, and L. Liu. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:213-27.
3. Yabe, K., and H. Nakajima. 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:745-55.
4. Chang, P. K., K. Yabe, and J. Yu. 2004. The *Aspergillus parasiticus estA*-encoded esterase converts versiconal hemiacetal acetate to versiconal and versiconol acetate to versiconol in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70:3593-9.
5. Yu, J., P. K. Chang, K. C. Ehrlich, J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, J. E. Linz, C. P. Woloshuk, and J. W. Bennett. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70:1253-62.
6. Ono, M., S. Sakuda, A. Suzuki, and A. Isogai. 1997. Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production by aflatoxigenic fungi. *J Antibiot (Tokyo)* 50:111-8.
7. Yan, P. S., Y. Song, E. Sakuno, H. Nakajima, H. Nakagawa, and K. Yabe.

2004. Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylooxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 70:7466-73.
8. Yabe, K., Y. Ando, M. Ito, and N. Terakado. 1987. Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. *Appl Environ Microbiol* 53:230-4.
 9. Hua, S. S., J. L. Baker, and M. Flores-Espiritu. 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant of *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 65:2738-40.
 10. Yabe, K., H. Nakamura, Y. Ando, N. Terakado, H. Nakajima, and T. Hamasaki. 1988. Isolation and characterization of *Aspergillus parasiticus* mutants with impaired aflatoxin production by a novel tip culture method. *Appl Environ Microbiol* 54:2096-100.

高圧二酸化炭素を用いた貯蔵食品害虫の殺虫技術

1. はじめに

貯蔵食品害虫は、その幼虫あるいは成虫が貯蔵中の穀類や食品を食害する昆虫であり、水分含量が15%以下の乾燥した食物で発育できるという特徴を持つ。その多くは小型（5mm以下）の甲虫類と蛾類である。例えば、米の害虫ではコクゾウムシ類やメイガ類、豆ではマメゾウムシ類、小麦粉など粉状の食品ではコクヌストモドキ類やヒラタムシ類、動物性の乾燥食品ではカツオブシムシ類が知られている。これらの昆虫の食害による食品の量的・質的な損耗の他にも、異物として害虫が食品に混入した場合、食品メーカーや流通産業関係者の衛生的責任が問われるなど大きな問題になっている。

貯蔵食品害虫の防除には、主に臭化メチルとリン化水素（ホスフィン）がくん蒸剤として長年使用されてきた。しかし、臭化メチルは地球のオゾン層を破壊する恐れがあることから、モントリオール議定書締約国会合（事務所ケニア：ナイロビ）により、先進国では2005年に検疫用途の一部を除き生産中止になった。現在使用可能な臭化メチルは、2005年以前に生産された使用期限内のもの、国際的に不可欠用途使用申請がなされ許可された量だけである。一方、近年、リン化水素抵抗性の貯蔵食品害虫が報告されており、リン化水素の使用には十分な知識と注意が必要である。また、農薬の使用は健康や環境への影響が懸念され、将来、使用が制限されると考えられる。このような状況を受けて、化学農薬によらない臭化メチル代替殺虫技術の開発が望まれている。本稿では、新しい技術として、高圧二酸化炭素を用いた殺虫技術について解説したい。この技術はすでに海外では実用化されており、日本における実用化についての現状と展望を紹介する。

2. 二酸化炭素の安全性

農薬を用いて貯蔵食品害虫を防除する際は、食品に対する残留性、人間の健康への影響が配慮された安全性の優れたものが好ましい。二酸化炭素は、通常、私たちが呼吸の過程で呼気として排出し、ビールや炭酸飲料からも体内に取り込んでおり、安全性の高いガスであることは利点である。高濃度の二酸化炭素は人間にも被害があるが、その毒性はこれまでくん蒸剤として使われてきた臭化メチルやリン化水素と比較すると極めて低い。8時間労働に必要な許容濃度値から推測すると、臭化メチルの1000倍、リン化水素の16000倍以上も安全である。

3. 二酸化炭素を用いた害虫防除法と殺虫メカニズム

貯蔵された穀物を加害する貯穀害虫（コクゾウムシ *Sitophilus zeamais*、コクヌ

ストモドキ *Tribolium castaneum*, バクガ *Sitotroga cerealella*) に対する防除では, 密封度の高い貯蔵庫に60%以上の二酸化炭素を送入して殺虫する方法があり, CA (Controlled Atmosphere) 法と呼ばれている。日本では1990年に貯穀害虫の農薬として登録された。しかし, この高濃度 (60~90%) の二酸化炭素だけを用いる方法は7~10日間の処理時間がかかり, 迅速な処理が必要な場合には不適であり普及が進んでいない。

低濃度の二酸化炭素は昆虫に対して麻酔作用をもち, 濃度が35%以上になると多くの昆虫に致死作用を示す。二酸化炭素の殺虫メカニズムについては, はっきりとは解明されていないが, 次に示す3つの仮説が考えられている。①二酸化炭素が神経軸索に作用して神経の伝達に重要な役割を果たすNa/Kイオンのバランスを崩す, ②二酸化炭素が昆虫の体液を酸性化し各種の酵素作用を阻害する, ③昆虫が酸素を取り入れる気門という孔を開閉する筋肉に作用し, 気門を開放状態にして体内水分を奪う。これらの作用が複合した結果として昆虫が死亡すると考えられる。

4. 高圧二酸化炭素処理装置とその操作手順

高圧二酸化炭素処理装置には, 高圧力に耐えられる圧力釜が必要であるが, 装置の構造は比較的単純である。主要なものは「液化炭酸ガスボンベ」と「高圧耐性の圧力釜」とそれらをつなぐ配管器具である。

装置の操作手順を図1に示す。まず, ①圧力釜に殺虫したい食品を搬入し, 圧力漏れがないようにしっかりとふたを閉める。②液化炭酸ガスボンベから二酸化炭素ガスと圧力を圧力釜に注入する。③一定の時間で殺虫する。④ガスと圧力を

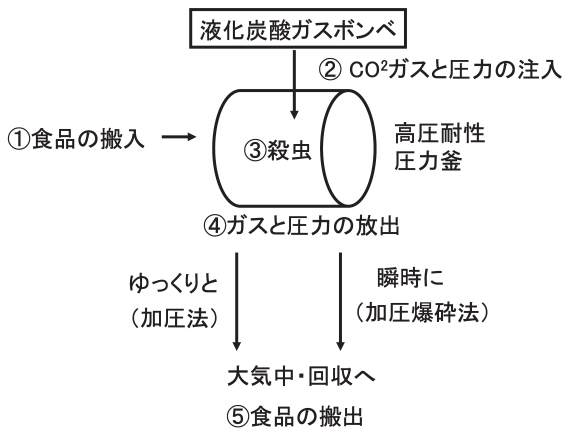


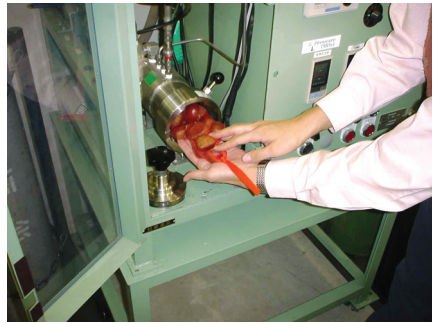
図1 高圧二酸化炭素処理装置の構造と操作手順



図2 小型高圧二酸化炭素処理装置（日東高圧㈱）



高圧耐性の圧力釜



圧力釜にクリ果実を入れる

図3 小型高圧二酸化炭素処理装置の圧力釜と食品（クリ）の導入

放出する。放出はゆっくり行う場合と瞬時に行う場合があり、食品によって使い分ける。⑤圧力が低下しガスを放出したら食品を搬出する。

筆者らの研究室では、小型装置（容積約1L）と大型装置（容積約100L）を製作し（日東高圧㈱）、貯蔵食品害虫の殺虫技術の開発を行っている（図2, 3）。

5. 研究の経緯と海外での実用例

高圧二酸化炭素を用いた害虫防除技術は、光榮ら（1973）が製粉製品を加害するケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* に対して圧力16kg/cm²、処理時間30分で駆除できることを示したのが最初の事例である¹⁾。その後、1985年ドイツで薬用植物の害虫を短時間で防除する研究が行われ、続いてフランスでも研究が行われている。日本では1980年代後半から中北らが独自に同様な研究を開始し、現在に至っている²⁾。

ドイツのMartin Bauer社は、自社の薬用茶（ハーブティー）の原料の害虫防除を目的として、1988年に大型の高圧二酸化炭素処理装置を完成させた。円筒形の圧力釜の容積は63m³（直径約2m、長さ約20m）である。処理温度は室温（冬季は15～20℃）、ハーブの搬入・搬出に要する時間はそれぞれ30分で、殺虫処理には2時間をかけている。二酸化炭素の85～90%を再利用する装置の場合、高圧釜が2基、二酸化炭素回収タンク、液体二酸化炭素のタンクがそれぞれ1基で構成され、装置の製造費は約2億円である³⁾。

現在のところ、装置の製造費や防除に要する費用が高価であるため、ドイツやフランスではペットフード、スパイス、ハーブなどの付加価値の高い食品に対して使われている。

6. 高圧二酸化炭素の殺虫効果

二酸化炭素を用いた害虫防除（CA法）の遅効性を解決する方法として、高圧



図4 高圧二酸化炭素処理により内臓が破裂したコクゾウムシ



図5 高圧二酸化炭素処理により内臓が破裂したヨツモンマメゾウムシ

力と二酸化炭素を同時に用いて短時間で殺虫可能な技術が高圧二酸化炭素処理である。高圧になるにつれ、昆虫の体内に溶け込む二酸化炭素の量が増加するため、常圧よりも短時間で殺虫効果をあげることができる。

高圧二酸化炭素を使った殺虫法には、高圧の状態からゆっくりと減圧する「加圧法」と、瞬時に減圧する「加圧爆砕法」の2種類がある(図1)。加圧爆砕法の場合、瞬時に高圧から大気圧にもどすことで急激な圧力差が生じ、昆虫体内に溶解していた二酸化炭素が瞬時に沸騰、膨張してその内臓器官が爆砕し体外に飛び出すため死亡する(図4, 5)。この方法は二酸化炭素自体の効果と爆砕という物理的効果の両方で殺虫効果が上がると思われる。

7. これまでの研究成果

殺虫効果

高圧二酸化炭素法を用いた害虫防除は主に貯蔵食品害虫を対象に研究されてきた。これまでの貯蔵食品害虫(鞘翅目7種・鱗翅目2種)に対する高圧二酸化炭素処理の条件(温度、圧力、処理時間、減圧時間)と致死効果について表1に示す⁴⁾。

高圧二酸化炭素は、5分から120分のきわめて短時間で多くの害虫種を完全殺虫できることがわかる。そして、卵の時期が最も耐性が強く、高圧二酸化炭素処理において、卵を十分に殺すことのできる条件(圧力や処理時間など)は、殺虫

表 1 高圧二酸化炭素処理による貯蔵食品害虫への致死効果 (Nakakita *et al.*, 2001を改変)

昆虫種	発育段階	温度 ℃	圧力 kg/cm ²	処理時間 分	死亡率 %	減圧時間
鞘翅目 Coleoptera						
グラナリアコクゾウムシ	卵	10	20	120	100	遅 (不明)
<i>Sitophilus granarius</i>	卵	20	20	60	100	
	幼虫	10-30	20	60	100	
	蛹	10-30	20	60	100	
	成虫	10-30	20	60	100	
コクゾウムシ	卵	25	20	5	21.9	早 (<1 秒)
<i>Sitophilus zeamais</i>	卵	25	30	5	100	
	幼虫	25	20	5	100	
	蛹	25	10	5	100	
	成虫	25	15	5	100	
ココクゾウムシ	卵	25	20	45	100	遅 (20 分)
<i>Sitophilus oryzae</i>	幼虫	25	20	45	100	
	蛹	25	20	45	100	
	成虫	25	20	15	100	
	ヒラタコクヌストモドキ	卵	25	30	5	100
<i>Tribolium confusum</i>	幼虫	25	20	5	100	
	蛹	25	20	5	100	
	成虫	25	15	5	100	
	タバコシバンムシ	卵	25	25	80	100
<i>Lasioderma serricorne</i>	卵	15	30	70	100	
	卵	25	30	52	100	
	卵	15	35	48	100	
	卵	25	35	36	100	
	卵	15	40	32	100	
	卵	25	40	20	100	
	幼虫	25	25	30	95	
	幼虫	35	25	15	95	
	幼虫	25	30	18	95	
	幼虫	35	30	3	95	
	成虫	25	20	5	100	早 (<1 秒)
	成虫	25	20	5	35	遅 (1 分)

表 1つづき

ノコギリヒラタムシ	卵	25	20	45	100	遅 (20分)
<i>Oryzaephillus surinamensis</i>	幼虫	25	20	30	100	
	幼虫	25	20	15	100	
	蛹	25	20	5	100	
	成虫	25	20	10	100	
ヒメアカカツオブシムシ	卵	30	20	30	100	早 (<1秒)
<i>Trogoderma granarium</i>	幼虫	30	20	10	100	
	成虫	30	10	10	100	
鱗翅目 Lepidoptera						
ノシメマダラメイガ	卵	25	20	20	100	早 (<1秒)
<i>Plodia interpunctella</i>	卵	25	20	9	100	遅 (1分)
	卵	25	20	12	100	早 (<1秒)
	卵	25	20	8	100	遅 (1分)
	卵	25	20	15	100	遅 (20分)
	幼虫	25	20	5	100	
	蛹	25	20	5	100	
ガイマイツヅリガ	卵	25	20	5	100	早 (<1秒)
<i>Corcyra cephalonica</i>	幼虫	25	20	5	100	
	蛹	25	10	5	100	

注. 減圧時間：遅は加圧法，早は加圧爆砕法による処理を示す

効果を高める上で重要である。

二酸化炭素濃度と殺虫率の関係は、濃度が高いほど殺虫率が高いことが、グラナリアコクゾウムシで報告されている⁵⁾。また、温度が高いほど効果的であると推測されているが、食品によっては高温条件がその品質に悪影響を及ぼす場合もあり、配慮が必要である。減圧時間は時間をかけず瞬時に放出すると殺虫効果上がるが、タバコシバンムシ成虫で示されている⁶⁾。

殺ダニ効果

貯蔵食品害虫以外にダニ類に対する高圧二酸化炭素の効果が調べられている(表2)。ダニ類に対して致死効果を期待する場合は、圧力20kg/cm²で20~30分の処理が必要である。

殺菌効果

これまでの研究から、高圧二酸化炭素処理は細菌や糸状菌に対して殺菌効果は期待できないと報告されている。

表2 高圧二酸化炭素処理によるダニ類への致死効果

ダニ種名	温度 (°C)	圧力 (kg/cm ²)	処理時間 (分)	死亡率 (%)
アシフトコナダニ	10	37	20	100
<i>Acarus siro</i>	10	30	40	100
	10	20	120	100
	20	16	55	100
ケナガコナダニ	20	16	55	100
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	20	21	30	100
	20	26	15	100
	30	16	25	100
	30	21	10	100
チューリップサビダニ*	25	20	10	100
<i>Aceria tulipae</i>	25	25	10	100

* 青木ら未発表

食品の品質への影響

ドイツのMartin Bauer社は、圧力20kg/cm²での処理におけるハーブの品質について、色、香り、味、構成成分などの項目について検討したが、その品質に影響しないことを確認している。

高橋ら(2001)は、玄米(茨城県産コシヒカリ)を圧力30kg/cm²、30分で処理し、5、10、15、20、25、30°Cの各温度で貯蔵し、それぞれ3、6、9、12ヶ月後の発芽率を調査した。その結果、15~30°Cのいずれの貯蔵温度でも処理米の発芽率は無処理米の発芽率に比較して低下したが、15~20°Cの6ヶ月間以内の貯蔵では大きな発芽率の低下は見られなかった。また、食味に関しては6ヶ月後に差が見られ、無処理米に比べ古米臭が強い傾向があった。1ヶ月貯蔵では「香り」、「かたさ」、「粘り」、「つや」のいずれの項目でも差はなかった⁷⁾。

筆者らは最近、複数の米品種「コシヒカリ」、「ミルキークイーン」、「夢十色」に対して、圧力30kg/cm²、30分処理し10°Cで3ヶ月貯蔵した後、食味を調べた。その結果、「コシヒカリ」、「ミルキークイーン」では無処理米と比較して食味が少し低下したが、「夢十色」ではほとんど差がなかった。

高圧二酸化炭素処理の適用限界

高圧二酸化炭素を用いた殺虫技術を適用する場合に注意する点を挙げておこう。

① 高圧耐性の圧力釜が必要である。



図6 クリシギゾウムシの幼虫とクリ被害

- ② 完全殺虫には圧力 $20\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上が必要である。
- ③ 瞬時に減圧すると食品によっては割れる場合がある。
- ④ 食品の組織が柔らかい場合（生鮮食品など）、高圧力により損傷を起こす場合がある。

8. 高圧二酸化炭素処理の新しい適用例

高圧二酸化炭素を用いた害虫防除は、貯蔵食品害虫を中心に研究されてきたが、現在でも新たな適用が試みられている。ここでは、筆者らが行った最近の適用例として、クリシギゾウムシとマメゾウムシ類およびコクゾウムシ類に対する効果を紹介する。

クリシギゾウムシに対する殺虫効果

クリシギゾウムシ *Curculio sikkimensis* はクリの重要害虫である。本種の成虫はクリ果実内に産卵し、幼虫が中身を加害した後に内部から穴を開けてクリから脱出する（図6）。穴が1個でも開いてしまえば、クリの商品価値が失われるので、これまでクリシギゾウムシの殺虫は、収穫後に臭化メチルによるくん蒸処理をして市場へ出荷されてきた。臭化メチルの生産中止を受けて、有力な代替技術がないために日本政府は臭化メチル不可欠用途使用申請（国内25県が申請）を行い、現在クリシギゾウムシ防除のために年間約7 tの消費量が認められている。しかし、この申請が長期間にわたり許可されるとは限らないことを考えると、有力な臭化メチル代替技術の開発は急務である。高圧二酸化炭素法の適用は、クリシギ



図7 大型高圧二酸化炭素処理装置（日東高圧㈱）

表3 高圧二酸化炭素を処理したクリから脱出したクリシギゾウムシ幼虫の平均頭数

圧力(kg/cm ²)	処理時間(分)	幼虫の平均頭数*
25	10	4
	30	0
30	10	1.33
	30	0
無処理		262.6

*各処理は3回繰り返した（クリ10kg）

ゾウムシ防除に対する有効な技術であると考え、完全殺虫が可能な処理条件について検討した。

クリから脱出してきた終齢幼虫に対して、圧力10、20、25kg/cm²のそれぞれにおいて処理時間5、10、30分の条件で高圧二酸化炭素処理したときの死亡率を調べた。その結果、10、20kg/cm²の条件では殺虫効果が低く、完全殺虫には25kg/cm²で10分以上の処理が必要であった（宮ノ下ら、未発表）。

さらに、実用化のためにクリ果実を大量に処理可能な円筒型装置（直径40cm・長さ155cm）を開発した（図7）。圧力釜の容積は103Lであり、クリ果実70kgを

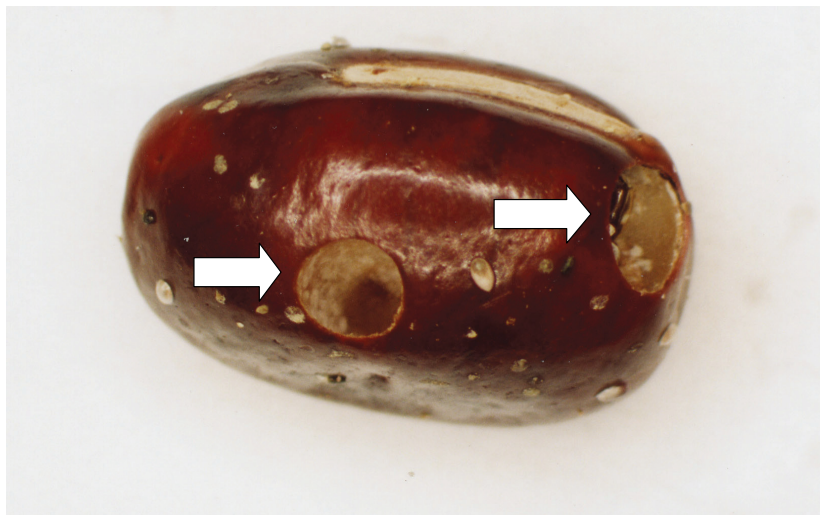


図8 マメゾウムシ類に加害され穴が開いたアズキ (大納言)
* 矢印は成虫が脱出した穴を示す

一度に処理できる。この装置を用いて被害クリ10kgで高圧二酸化炭素処理を行ったところ、圧力30kg/cm²、処理時間30分でクリシギゾウムシが完全殺虫された^{8), 9)} (表3)。作業時間は、ガスと圧力の注入に10分、殺虫処理に30分、圧力とガスの放出に10分である。1回の処理が50分で行えることから、臭化メチルを用いた2～3時間のくん蒸に比べると短時間で殺虫が可能である。

ただし、クリ果実を処理する場合、ガスと圧力を瞬時に放出するとクリ果実が割れてしまうため、2分以上かけて放出することが重要である。

高圧二酸化炭素処理のクリ果実成分に対する影響について、無処理、圧力 15 kg/cm²、30分処理および圧力30kg/cm²、30分処理の条件で比較した結果、水分、果糖、ブドウ糖、でんぷん、ビタミンC、タンニンの量には大きな差はなかった。

マメゾウムシ類に対する殺虫効果

アズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis* やヨツモンマメゾウムシ *C. maculatus* は貯蔵アズキの重要害虫である。両種は、アズキの表面に産卵し、卵から孵った幼虫は粒子の内部へ穿孔する。幼虫はアズキ内部を加害して発育し、蛹を経て成虫になった後、穴を開けて脱出する。これらマメゾウムシ類の加害によってアズキに穴が開くとその商品価値は失われるため(図8)、殺虫技術が必要となっている。高圧二酸化炭素処理がコメの内部を加害するコクゾウムシに対して有効であるので、同様に豆類の内部を加害するマメゾウムシ類にも適用可能と考えた。

近年、筆者らは、ヨツモンマメゾウムシの異なる日齢の卵に対する高圧二酸化

表4 高圧二酸化炭素を用いたヨツモンマメゾウムシの異なる日齢卵の殺卵効果

圧力(kg/m ²)	処理時間(分)	平均殺卵率 (%)				
		卵の日齢(日)				
		1	2	3	4	5
15	5	26.2	35.5	50.9	56.3	77.5
	10	31.8	42.2	57.5	65.6	81.2
	15	48.1	48.9	65.7	75.3	89.7
	20	43.7	53.8	72.8	81.6	95.5
20	5	36.6	44.9	71.2	80.7	98.1
	10	45.3	52.2	86.4	93.7	100.0
	15	48.2	54.9	93.3	98.1	100.0
	20	58.4	69.7	94.4	100.0	100.0
25	5	55.6	65.9	93.8	100.0	100.0
	10	68.7	79.9	97.6	100.0	100.0
	15	72.1	94.4	100.0	100.0	100.0
	20	86.0	79.8	100.0	100.0	100.0
30	5	88.5	98.3	100.0	100.0	100.0
	10	93.8	100.0	100.0	100.0	100.0
	15	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0
	20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
無処理		16.2	17.5	13.2	17.5	16.5

注．実験は温度 25℃・湿度 70%で行い，各処理は 4 回繰り返した

炭素の殺卵効果を調べた。産卵後 1 日齢の卵が最も耐性が強く，日齢を重ねることに耐性が弱くなり，5 日齢では最も弱かった¹⁰⁾ (表 4)。全ての日齢の卵を完全殺卵するためには，圧力 30kg/cm²，処理時間 20 分を必要とした。これまでの研究より，卵が最も耐性があるとすると，上記の条件ですべての発育ステージを殺虫できると考えられる。そこで，アズキゾウムシとヨツモンマメゾウムシについて，卵・幼虫・蛹・成虫の全ての発育ステージに対する高圧二酸化炭素の殺虫効果を調べた結果，卵が最も耐性が強いことが確認された (Shazali *et al.*，未発表)。

くん蒸との併用によるコクゾウムシおよびグラナリアゾウムシの殺卵効果

効果的な殺虫効果を得るには圧力 20kg/cm²以上が必要であるが，そのような圧

力釜の製造にはコストがかかる。そこで、圧力15kg/cm²程度の耐圧構造をもつ圧力釜を低コストで製造し、くん蒸剤と高圧二酸化炭素を併用して効果をあげることができないだろうか。筆者らと横浜植物防疫所は、高圧二酸化炭素処理単独の場合（温度25°C、圧力15kg/cm²程度で30または60分）と同条件に7種類のくん蒸剤を添加した場合の殺卵効果をコクゾウムシとグラナリアコクゾウムシ*S. granarius*でそれぞれ比較した。その結果、2種類共にくん蒸剤を添加した場合の方が殺卵効果は向上するものの、今回のような短時間の処理では検疫処理（100%殺虫）として十分な効果を期待できないことが示された¹¹⁾。

9. おわりに：日本における実用化の現状と展望

高圧二酸化炭素を用いた殺虫技術は海外ではすでに実用化されているが、日本においては実用化された事例はまだない。最も大きな理由は、高圧釜を含めた装置の製造費が高いからであろう。しかし、処理時間が極端に短い、ガスの毒性が低い、残留性の問題がないことは実用化に向けて大きな長所である。また、二酸化炭素の使用は無農薬を主張できる点で、消費者に対する受けも良いと思われる。

日本において現在最も実用化の可能性があるのは、クリシギゾウムシに対する殺虫技術であろう。臭化メチルが生産中止になり、その代わりになる有力な殺虫技術がないからである。臭化メチル不可欠用途使用申請が不許可になりその代替技術がなかった場合、クリ生産者にとって死活問題に発展すると予想される。クリシギゾウムシ殺虫に対する高圧二酸化炭素法の処理条件は、すでに確立されている方法として導入可能である。

（流通安全部 食品害虫研究室 宮ノ下明大・今村 太郎）

参考文献

- 1) 光楽昭雄, 天野立爾, 田辺弘也, ケナゴコナダニに対する加圧ガスの致死効果について, 食衛誌, 14 (6), 511-516 (1973) .
- 2) Nakakita, H., and K. Kawashima, A new method to control stored product insects using carbon dioxide with high pressure followed by sudden pressure loss. In Proc. 6th Int. Work. Conf. Stored-product Protection, eds. Highley, E., Banks, E. J. and Champ, B. R. CAB International, Canberra, Australia, pp126-129 (1994) .
- 3) 平野耕治, 中北 宏, 高圧炭酸ガスによる貯蔵食品害虫の新駆除法, 植物防疫, 49 (1), 24-28 (1995) .
- 4) Nakakita, H., H. Ikenaga and K. Takahashi, Disinfestation of stored grains using high-pressure carbon dioxide. In Proc. Int. Conf. Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Fresno, CA, eds. Donahaye, E. J., Navarro, S., and Leesch, J. G. Executive Printing

- Services, Clovis, CA, USA, pp421-430 (2001) .
- 5) Prozell, S. and C. Reichmuth, Response of the granary weevil *Sitophilus granarius* (L) (Coleoptera: Curculionidae) to controlled atmosphere under high pressure. In Proc. 5th Int. Work. Conf. Stored-product Protection, eds. Fleurat-Lessard, F. and Ducom, P. Bordeaux, France, pp. 911-918 (1991) .
 - 6) Ulrich, C. , Effects of different speed of buildup and decrease of pressure with carbon dioxide on the adults of the tobacco beetle *Lasioderma serricorne* (F) (Coleoptera: Anobiidae) . In Proc. 6th Int. Work. Conf. Stored-product Protection, eds. Highley, E. , Banks, E. J. and Champ, B. R.). CAB International, Canberra, Australia, pp214-216 (1994) .
 - 7) 高橋敬一, 宗田奈保子, 内藤成弘, 池長裕史, 中北 宏, 岡留博司, 豊島英親, 大坪研一, 玄米の高圧二酸化炭素処理が発芽率および食味に及ぼす影響, 食総研報, 65, 33-37 (2001) .
 - 8) 宮ノ下明大, 今村太郎, 高圧二酸化炭素を用いたクリシギゾウムシの防除, 食品研究成果情報, 15, 20-21 (2003) .
 - 9) 宮ノ下明大, 高圧炭酸ガスを用いたクリシギゾウムシの防除, 果実日本, 58 (1), 40-43 (2003) .
 - 10) Shazali, M. E. H., T. Imamura, A. Miyanoshita, Mortality of eggs of the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoprera: Bruchidae) in carbon dioxide under high pressure. *Appl. Entomol.Zool.* 39(1), 49-53 (2004) .
 - 11) 小川 昇, 内藤浩光, 谷川展暁, 後藤睦郎, 三角 隆, 相馬幸博, 池長裕史, 今村太郎, 宮ノ下明大, くん蒸剤を添加した高圧炭酸ガス処理によるコクゾウムシ *Sitophilus zeamais* Motschulsky及びグラナリアコクゾウムシ *Sitophilus granarius* L.の殺卵効果, 植防研報, 41, 31-33 (2005) .

食品成分による肝臓と脂肪組織の脂質代謝制御機構

1. はじめに

第二次世界大戦以降、食生活が豊かになるにつれて日本国民の健康が向上し、平均寿命が順調に延伸する一方、食生活の欧米化に伴う生活習慣病の発症が増加し、食生活の改善が呼びかけられている。ここ数年の間、健康的な食生活への国民の関心は非常に高まっており、健康に役立つ食材や食品成分が各種メディアで紹介されると翌日にはその食品が日本中の店先から消えることが度々生じている。生活習慣病の中でも肥満は食生活の影響を受けやすく、肥満自体には痛みや切迫した自覚症状を伴わず致命的なものではないが、肥満状態が進行あるいは持続することで糖尿病や心臓疾患、脳血管障害のような生命に関わる疾患を誘発するリスクが高まる。日本ではこのような肥満を原因とする疾病の罹患率、死亡率は依然として高い水準で推移している。万病の源とも言える肥満を予防、改善する方策として第一に挙げられるのは食生活の改善であり、摂取エネルギーやPFCバランス（タンパク質：脂肪：炭水化物の摂取比率）の見直し、生体の代謝調節作用がある成分を含む食品の選択的摂取などがその主な対策となる。食事を摂るヒトの側で肥満に最も大きく関わっている生体機能は脂質代謝であり、既にいくつかの食品成分に脂質代謝改善作用があることが示されている。本稿では食品成分が脂質代謝の中心となる肝臓と脂肪組織の機能にどのような影響を与え、肥満抑制や血中脂質濃度の低下作用にどのように関わっているかを、私どもの研究室で行ってきた研究結果より紹介し、さらに食品成分の機能性に関する今後の研究の方向について述べる。

2. 脂質代謝における肝臓と脂肪組織の役割

食餌より生体内に取り込まれた脂肪は胃腸内での消化作用により分解された後、小腸より吸収されて血液中に入り、全身に運ばれエネルギー源として利用される。余分な脂質は皮下や腹腔にある脂肪組織に入り、体脂肪として貯蔵される。肝臓では脂肪は分解されてエネルギーとして利用されるが、エネルギー過剰の場合は脂肪が合成される。また肝臓の脂質代謝には、脂肪からコレステロールや胆汁などへの変換も含まれる。

2.1 肝臓での脂質代謝

肝臓は脂質に限らず、糖質やタンパク質のようなエネルギー源となりうる栄養素の分解、合成、変換、貯蔵を盛んに行っている。肝臓の脂質代謝における主要な役割は以下の通りである¹⁾。1) コレステロールから胆汁酸塩を生成して腸管での脂質の消化吸収を促進する。2) 脂肪酸の合成や酸化、中性脂肪・リン脂質・

コレステロールの合成を行う。3) 血清中で脂質を輸送するためのリポタンパク質を合成する。4) 脂肪酸からケトン体を合成する。

血清リポタンパク質や中性脂肪の合成などを行う肝臓での脂質代謝の変化は、血清脂質濃度に直接的な影響を与える²⁾。コレステロールや中性脂肪などの血清脂質濃度を制御する因子で重要なものとして挙げられるのが、肝臓での中性脂肪の合成と分解速度のバランスである。肝臓での中性脂肪合成に使われる脂肪酸には、グルコースなどを炭素源として合成されるもの、脂肪組織から脂肪分解によって動員されるもの、食餌脂質に由来するものなどがある。肝臓に供給された脂肪酸は、グリセロールとのエステル化により中性脂肪やリン脂質のような脂質に合成され、一部の脂肪酸は肝臓で生成される中性脂肪を主要成分とした超低密度リポタンパク質(VLDL)の構成成分として取り込まれて血清中に分泌される。脂肪酸合成系が低下すると中性脂肪など血清脂質の合成基質が減少し、結果として血清脂質濃度が低下する。脂肪酸はアセチル-CoAカルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素の働きにより合成されるが、合成に必要なNADPHの供給に関与するグルコース6-リン酸脱水素酵素とリンゴ酸酵素、細胞質でのアセチルCoA合成に関与するATP-クエン酸リアーゼなども脂肪酸合成系の変化に連動して制御される³⁾。この脂肪酸合成系経路は、個体や組織の栄養状態によって調節されることが明らかになっている。脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現を調節する転写因子として注目されているものに、ステロール調節エレメント結合タンパク質(SREBP)がある³⁾。SREBPは核内タンパク質の一種で、コレステロールによる低密度リポタンパク質(LDL)受容体とコレステロール合成系酵素の遺伝子発現抑制作用に関わるシスエレメント、ステロール調節エレメント(SRE)に結合する。SREBPにはSREBP-1(同一遺伝子で転写開始点の違いによりSREBP-1aとSREBP-1cが存在する)とSREBP-2の2種類があり、SREBP-1は主としてATP-クエン酸リアーゼ、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、脂肪酸合成酵素のような脂肪酸合成系酵素、SREBP-2はコレステロール合成系酵素とLDL受容体遺伝子の発現調節に関与すると考えられている(表1)^{4,5)}。

表1 SREBPサブファミリーと肝臓・脂肪組織での役割³⁾

	発現が強い臓器	機能	制御因子
SREBP-1a	脾臓など	コレステロール、脂肪酸、中性脂肪の合成に関わるタンパク質遺伝子発現の活性化(SREBPsによって制御される遺伝子全般)	プロモーター領域に核ホルモンレセプター-LXRが結合することで転写活性が上昇し、長鎖不飽和脂肪酸によって転写活性が減少する。SREBP-1cはインスリンによって上昇する。
SREBP-1c	肝臓、脂肪細胞、副腎、脳	脂肪酸、中性脂肪、リン脂質の合成に関わる遺伝子発現の活性化、脂肪細胞の分化と脂質蓄積	
SREBP-2	肝臓	コレステロール合成に関わる遺伝子発現の活性化	低コレステロール時に転写活性が上昇する

一方、脂肪酸の分解は脂肪酸酸化により行われ、脂肪酸から β 酸化の過程でアセチル-CoAを生じ多量のエネルギー産生を伴う。肝臓での β 酸化系はミトコンドリアとペルオキシゾームの両細胞小器官に存在する。この β 酸化は脂肪酸合成系と比べ、基質特異性の異なる多くの酵素から構成されている⁶⁾。これらの脂肪酸酸化系酵素による代謝も、脂肪酸合成系酵素と同様に栄養条件によって調節される。脂肪酸酸化系酵素の遺伝子発現を調節する転写因子として、ペルオキシゾーム誘導剤活性化受容体(PPAR)が発見された。哺乳動物には α 、 δ (β)および γ の3種類のPPARがあることが知られている(表2)³⁾。PPAR γ には γ 1と γ 2の2つのアイソフォームが存在する。PPAR α は肝臓、心臓、腎臓、小腸、褐色脂肪組織に多く発現し、PPAR γ 2は白色脂肪組織に高い発現が見られる。PPAR δ と γ 1は種々の組織に発現する。 β 酸化系を構成するペルオキシゾーム酵素のアシルCoA酸化酵素と二頭酵素遺伝子はPPAR α によって活性化されていることが証明されている他、ミトコンドリア酵素も含めて数多くの酵素遺伝子発現がPPARによって制御されていることが明らかにされている。PPARsによる転写活性調節に関与するリガンドのひとつとして脂肪酸が挙げられている^{7,8)}。

2.2 脂肪組織での脂質代謝

脂肪組織は中性脂肪の形でエネルギーを蓄える臓器である。脂肪組織に貯蔵されている中性脂肪量は常に脂肪分解と再エステル化(合成)の速度で調節され、それぞれの過程は栄養や代謝状態、インスリンをはじめとするホルモンなどの内分泌因子等により制御されている。この分解と合成のバランスが脂肪組織から血清中に供給される脂肪酸の量を決定する。一方、最近の研究により、脂肪組織は受動的にエネルギーを蓄えるだけでなく、活発な代謝活性を持ち生体のエネルギー代謝全般に重要な役割を果たしていることが明らかになっている⁹⁾。また分子生物学的解析から、脂肪組織は外界からの刺激に応じて活発にホルモンやサイ

表2 PPARサブファミリーと肝臓・脂肪組織での役割³⁾

	発現が強い臓器	機能	制御因子
PPAR α	肝臓、消化管、腎臓など	肝臓での脂肪酸 β 酸化促進、脂肪酸取り込み	空腹時やフィブレートなどの脂肪酸 β 酸化促進剤によって上昇、脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸)
PPAR δ (β)	多くの臓器で広く発現、筋肉	筋肉での脂肪酸利用	飽和・不飽和脂肪酸
PPAR γ 1	脂肪細胞、肝臓など	脂肪細胞の分化、脂質貯蔵	インスリン増感剤、多価不飽和脂肪酸(エイコサペンタエン酸、アラキドン酸)
PPAR γ 2	白色脂肪組織に多く発現		

トカインを分泌し、全身にシグナルを発信する重要な内分泌臓器であることも分かってきた。脂肪細胞から放出されるタンパク質因子には、インスリン抵抗性を高める作用のあるTNF- α (tumor necrosis factor- α)、血圧上昇因子であるアンジオテンシノーゲン、さらに血栓形成に関わるとされるプラスミノゲン活性化阻害因子-1 (PAI-1)、その他、糖尿病、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧を亢進する因子などがある(図1)¹⁰。脂肪細胞は食欲低下の誘導や脂肪組織量の調節に関与すると考えられているレプチンや、インスリンの感受性を上昇させるアディポネクチンのような脂質代謝を改善する因子も分泌する。リポタンパク質リパーゼ(LPL)は血清リポタンパク質から脂肪細胞に脂肪酸を取り入れる働きを行う。取り込まれた脂肪酸は中性脂肪に転換され、脂肪組織に蓄えられる。また、脂肪酸だけでなくグルコースも中性脂肪合成の材料となる。グルコース輸送体4 (GLUT4)は脂肪細胞で強い発現が見られ、血液中のグルコースを脂肪細胞内に輸送する。取り入れられたグルコースは脂肪酸に転換され、脂肪組織の脂肪合成の基質となる。この過程はインスリンによって調節され、インスリン依存性の血糖制御機構において重要な役割を果たしている(図2)⁹。

脂肪組織量の増加は、脂肪細胞の体積増加、つまり細胞の肥大と、脂肪細胞数の増加、すなわち増殖によって起こる¹¹。脂肪組織は中性脂肪からなる脂肪滴を蓄えた成熟脂肪細胞と未熟な前駆脂肪細胞から成り立っている。脂肪組織量の増加は脂肪細胞での中性脂肪の合成・貯蔵による脂肪滴の増大から起こり、脂肪の貯蔵が限界に達すると脂肪細胞を増殖させて対応する。脂肪細胞の増殖は微細な脂肪滴を含む前駆脂肪細胞だけでなく、成熟脂肪細胞でも見られる。前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化を制御する因子には成長ホルモンやインスリンなどがあるが、食品成分では脂肪酸やビタミンA、ビタミンDが脂肪細胞の分化に関与するPPAR γ 2のリガンドとなる¹²。

一般の脂肪組織が白色脂肪組織と称されるのに対し、褐色脂肪組織と呼ばれる別の脂肪組織も存在する(図3)。白色脂肪細胞が比較的大型の細胞で、その大部分が単一の巨大な脂肪滴で占められ、核や細胞質は周辺部に押しやられた単房性の構造であるのに対し、褐色脂肪組織を構成する褐色脂肪細胞は白色脂肪細胞より小さく、脂肪も多くの小滴に分かれた多房性構造となっており、それに近接して多くのミトコンドリアが存在している。褐色脂肪組織では脂肪酸を酸化分解して熱エネルギーに変換して放散する機能を持つことから、肥満抑制に関与していると考えられている。この熱産生作用は褐色脂肪細胞特異的に発現する脱共役タンパク質1 (UCP1)によるものである(図2)。

脂肪細胞の分化・増殖や脂肪組織での脂質代謝の制御にも、転写因子として肝臓と同様にSREBPやPPARが関与している(表1, 2)。

図1 脂肪細胞から血液中に分泌される代謝制御因子¹⁰⁾

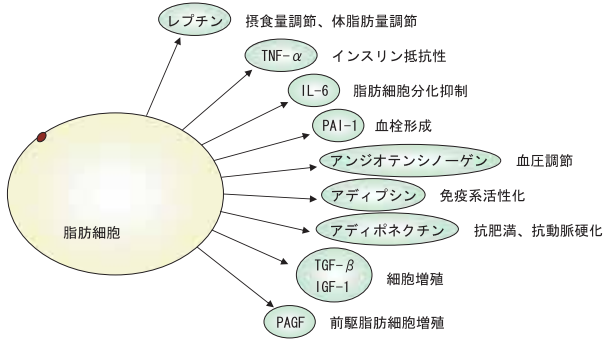


図2 白色脂肪組織(左)と褐色脂肪組織(右)での脂質・グルコース代謝

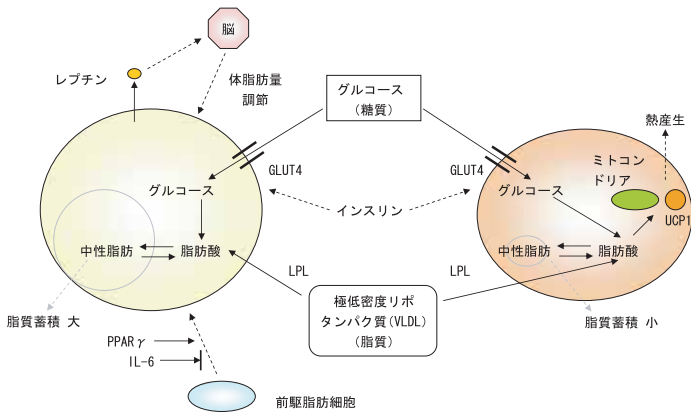
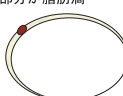



図3 白色脂肪組織と褐色脂肪組織の違い

白色脂肪組織		褐色脂肪組織
皮下、内臓周辺を中心に、全身に広く分布	分布	肩甲骨間、腋下、腎周囲など限定的で少量
細胞体の大部分が脂肪滴	脂肪細胞の形態	細胞内に小さな脂肪滴が存在、ミトコンドリアや神経、血管分布が豊富
		
50~100 μm	大きさ	20~40 μm
エネルギーの貯蔵と放出	生理的役割	脂肪酸燃焼による熱産生
血中から余剰の脂肪酸やグルコースを取り込んで中性脂肪としてエネルギーを貯蔵、エネルギー不足時には中性脂肪を分解して脂肪酸を血中に放出する	脂肪細胞での脂質代謝	脂肪を酸化分解することにより、UCP1を介しATP生成を伴わずに熱産生を行う。グルコースから脂肪を合成する一方、脂肪分解も盛んに行う。

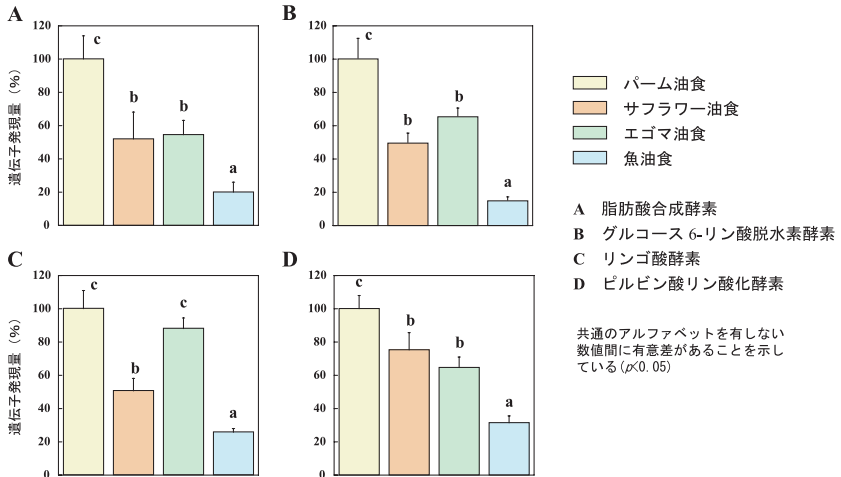
3. 脂質代謝を制御する食品成分

生体内での脂質代謝は個体や組織の栄養状態によって調節される。脂質代謝はアナボリックな代謝系である脂肪酸合成系とカタボリックな代謝系である脂肪酸酸化系とが協調的に制御されることでバランスが保たれると考えられるが、実際には両代謝経路はそれぞれ独立した制御機構を持ち、内分泌系や食品成分等の制御因子により支配されている。私どもの研究室では多価不飽和脂肪酸を中心に、脂質代謝を制御する食品成分の作用を研究してきた。以下に、肝臓や脂肪組織での脂質代謝調節機能を持つ食品成分と、その作用メカニズムの例を挙げる。

3.1 n-3系多価不飽和脂肪酸

脂質代謝調節作用を持つ多価不飽和脂肪酸として、n-6系不飽和脂肪酸のリノール酸(18:2)、n-3系不飽和脂肪酸である α -リノレン酸(18:3)、エイコサペンタエン酸(EPA, 20:5)、ドコサヘキサエン酸(DHA, 22:6)などが知られている。特にn-3系不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸と比較したとき、血清脂質濃度を低下させる作用が強い。肝臓での脂肪酸合成系活性低下は、血清脂質低下の大きな要因である。ラットを用いた動物実験では、飽和脂肪酸に富むパーム油食を摂取した群に比べて、リノール酸が主成分のサフラワー油、 α -リノレン酸が多いエゴマ油、EPAとDHAが豊富な魚油を与えると血清脂質濃度が低下し、肝臓の脂肪酸合成系酵素の活性と遺伝子発現量が減少した(図4)¹³⁾。脂肪酸合成系の低下はサフラワー油とエゴマ油でほぼ同等であったが、魚油はより大きな減少を引き起こした。この原因として、n-3系脂肪酸に富む魚油はn-6系脂肪酸が主成分のサフラワー油と比べてマウス肝臓のSREBP-1c遺伝子発現量をより大きく低下させることが報告されている¹⁴⁾。また、核内レセプターであるliver X receptor (LXR)とretinoid X receptor (RXR)はヘテロダイマーを形成し、SREBP-1cのプロモーター領域にあるLXRエレメントに結合し、SREBP-1cの遺伝子発現を増加させることが知られている。多価不飽和脂肪酸はLXR/RXRのLXRエレメントへの結合を阻害しSREBP-1c発現を抑制するが、その抑制はn-6系脂肪酸のリノール酸よりもn-3系のEPAやDHAで大きいこと¹⁵⁾も報告されている。一方、食餌不飽和脂肪酸は肝臓脂肪酸酸化系にも大きな影響を与える。脂肪酸酸化系酵素活性と遺伝子発現量はパーム油摂取群とサフラワー油摂取群でほぼ同等であったが、n-3系不飽和脂肪酸を含むエゴマ油と魚油摂取ではより高い活性と発現量を示した¹³⁾。従って、魚油の強い血清脂質濃度低下作用は、肝臓での脂肪酸合成の低下に加え、脂肪酸酸化の亢進が要因になると考えられる。多価不飽和脂肪酸はPPAR α のリガンドとして脂肪酸酸化系酵素の遺伝子発現を活性化させ、脂肪酸の分解を促進するが、n-6系脂肪酸のリノール酸やアラキドン酸、またn-3系脂肪酸の α -リノレン酸、EPAやDHAのPPAR α との結合力やPPAR α の活性化能には大きな差は見られない¹⁶⁾。従って、種々の異なった多価不飽和脂肪酸を含む油脂がラット肝臓の脂肪酸酸化

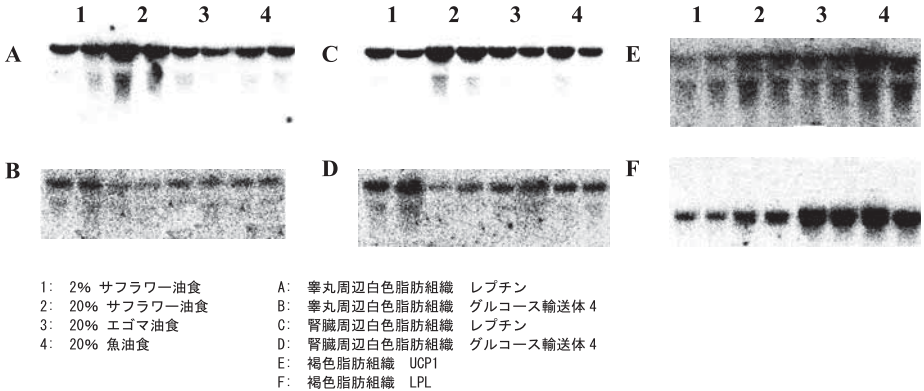
図4 食餌n-3系脂肪酸による肝臓脂肪酸合成系酵素遺伝子発現量への影響



系に与える影響の違いを、多価不飽和脂肪酸のPPAR α に対する作用の違いで説明することは難しい。 α -リノレン酸を多く含むエゴマ油の血清脂質低下作用はサフラワー油よりも優れるが、魚油よりはその効果が小さい。エゴマ油はリノール酸が主成分のサフラワー油と比較して脂肪酸酸化を亢進するが、脂肪酸合成には影響を与えないことがその生理作用の違いの原因と考えられる。

食餌不飽和脂肪酸は脂肪組織の脂質代謝にも影響を及ぼす。脂肪細胞で多く発現する脂質代謝に関連する遺伝子のうち、前章で取り上げたLPL、レプチン、GLUT4、UCP1(図2)の遺伝子発現量に対する食餌油脂の影響を検討した。n-6系脂肪酸油脂のサフラワー油を2%含む低脂肪食と、サフラワー油、n-3系脂肪酸油脂のエゴマ油および魚油をそれぞれ20%ずつ含む高脂肪食をラットに与えて比較したところ、高脂肪食は低脂肪食と比較してLPLのmRNA量を腎臓周辺白色脂肪組織で約30%、肩甲骨間の褐色脂肪組織では70-90%増加させたが、睪丸周辺の白色脂肪組織では増加が見られず組織特異的な応答があった¹⁷⁾。しかし、油脂の種類による応答に差はみられなかった。白色脂肪組織でのレプチン発現量は低脂肪食と比較しn-6系脂肪酸油脂で増加したが、n-3系脂肪酸油脂では増加は抑制された(図5)。さらにGLUT4発現量はn-6系脂肪酸油脂により低下したが、n-3系脂肪酸油脂では減少幅が小さくなった。褐色脂肪組織では、高脂肪食はUCP1の発現量を増加させたが、増加の程度はn-6系よりもn-3系脂肪酸油脂でより大きくなった。このような結果から、n-3系不飽和脂肪酸は脂肪組織での脂質代謝関連遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが推察される。実際

図5 n-3系脂肪酸と褐色脂肪組織での遺伝子発現



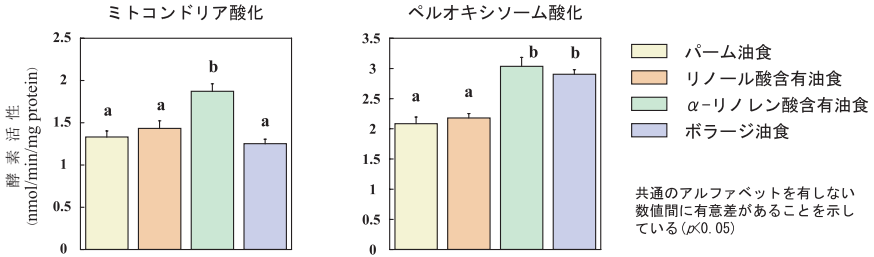
にこの実験で白色脂肪組織重量は、サフラワー油食群よりもエゴマ油，魚油食群で低下し，n-3系不飽和脂肪酸は体脂肪蓄積を抑制する効果を持つことが示された。褐色脂肪組織でUCP1発現量が増加することにより脂肪酸燃焼が亢進したことがその一因であると推察できる。また，脂肪組織のレプチン発現量は脂肪蓄積量と正の相関を示したことから，n-3系脂肪酸による発現低下は体脂肪重量の増加抑制を反映したものと推察された。また，脂肪組織のGLUT4遺伝子発現量減少は高脂肪食によるインスリン抵抗性の増大と高血糖を引き起こす大きな要因となるが，n-3系脂肪酸はこの発現量低下を妨げインスリン抵抗性を緩和しているものと考えられた。

3.2 γ -リノレン酸

γ -リノレン酸(18:3, n-6)は月見草油やボラージ油（植物の一種ルリジサの種子油）など，主に健康食品として市販されている油脂に多く含まれるn-6系多価不飽和脂肪酸である。生体内ではリノール酸から合成される。 γ -リノレン酸の健康へのプラス効果として，血管拡張作用や血小板凝集抑制作用，動脈硬化や高脂血症の予防作用が研究されている。

γ -リノレン酸が肝臓での脂肪酸酸化活性を上昇させることはTakadaraの研究で示されていた¹⁸⁾。私どもの研究室では， γ -リノレン酸とn-3系不飽和脂肪酸の α -リノレン酸が肝臓脂肪酸酸化系と合成系酵素活性に与える影響を比較した。脂肪源としてパーム油，リノール酸を70%含む油脂，リノール酸39%+ α -リノレン酸31%を含む油脂，リノール酸39%+ γ -リノレン酸26%を含むボラージ油をそれぞれ15%添加した食餌を4群に分けたラットに15日間摂食させた。パーム油やリノール酸油脂と比較して，肝臓ミトコンドリアでのパルミトイルCoA酸化

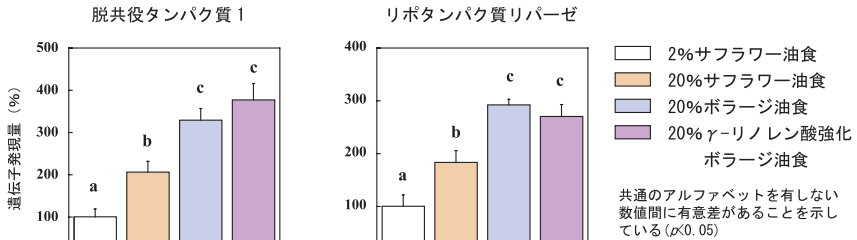
図6 γ -リノレン酸の肝臓脂肪酸酸化活性(パルミトイルCoA酸化)



は α -リノレン酸に富む油脂食により上昇したが、ボラージ油食群では増加は認められなかった。一方、ボラージ油食と α -リノレン酸食はペルオキシソーム β 酸化活性を同程度上昇させた(図6)¹⁹⁾。また、ペルオキシソームの脂肪酸酸化を調節するアシルCoA酸化酵素の活性は γ -リノレン酸および α -リノレン酸に富む油脂の投与で上昇し、ミトコンドリアの脂肪酸酸化に関わるカルニチンパルミトイル転移酵素活性はボラージ油食により上昇したが、上昇の程度は α -リノレン酸を含む油脂食よりも小さかった。従って γ -リノレン酸は α -リノレン酸と同様に肝臓の脂肪酸酸化活性を上昇させるが、 α -リノレン酸がミトコンドリアとペルオキシソームの両方で脂肪酸酸化を増加させるのに対し、 γ -リノレン酸はペルオキシソームでのみ脂肪酸酸化系を活性化させることが示された。脂肪酸合成系への影響については、脂肪酸合成酵素など代表的な酵素の活性を指標として評価した。パーム油食群と比較して α -リノレン酸や γ -リノレン酸に富む油脂は脂肪酸合成系酵素の活性を減少させたが、低下の度合はリノール酸に富む油脂で観察されるものと同様であり、脂肪酸特異的な作用は見られなかった。

γ -リノレン酸が脂肪組織の脂質代謝に与える影響は、脂肪組織で発現する代謝関連遺伝子の発現量を指標として評価した。リノール酸に富むサフラワー油を2%添加した低脂肪食、または、サフラワー油、 γ -リノレン酸を25%含むボラージ油、 γ -リノレン酸含有量を47%に高めたボラージ油をそれぞれ20%含む高脂肪食をラットに与えた。体重と摂食量に油脂の種類による違いは見られなかったが、白色脂肪組織重量はサフラワー油食と比べてボラージ油食で減少し、 γ -リノレン酸含量を高めたボラージ油でより大きな低下が認められた²⁰⁾。白色脂肪組織でのGLUT4とLPLの遺伝子発現量は高脂肪食群間で差はなかった。腎臓周辺白色脂肪組織でのレプチンの遺伝子発現量は低脂肪食群より高脂肪のサフラワー油食群で発現量が増加し、ボラージ油食群ではサフラワー油食群よりもレプチンの発現量が抑制され、 γ -リノレン酸含量の高いボラージ油でより大きな発現低下が観察された。これは γ -リノレン酸による脂肪組織重量の増加抑制に対応し

図7 γ -リノレン酸による褐色脂肪組織での代謝遺伝子発現量の変化



た変化と考えられる。一方、褐色脂肪組織ではUCP1遺伝子発現量がサフラワー油食と比較してボラージ油食で1.6倍から1.8倍上昇した（図7）。同時にLPL遺伝子発現量もボラージ油食群で高くなった。このことから、褐色脂肪組織ではUCP1による脂肪酸燃焼が高まり、LPL発現上昇により燃焼する脂肪酸の供給を増加させている可能性が示唆された。従って γ -リノレン酸を含む油脂摂取による白色脂肪組織量の増加抑制作用は、褐色脂肪組織でのUCP1発現上昇を介した脂肪酸消費の増加に起因すると考えられた。

3.3 共役リノール酸 (conjugated linoleic acid, CLA)

CLAは二重結合が共役したリノール酸(18:2, c-9, c-12)の位置および幾何異性体混合物の総称である。CLAは反芻動物の腸内細菌叢の働きにより生成するので、乳製品や牛脂に含まれる。これらの食品中に含まれる主要なCLAはc-9, t-11異性体で、その含量は脂肪1g当たり1~7mgと報告されている²¹⁾。CLAの生理学的作用として、体脂肪減少作用や心血管病リスク低下作用などが知られている。私どもはマウスを用い、CLAが脂肪組織や肝臓の脂質代謝に及ぼす影響について研究してきた。

C57BL/6J系とICR系の雄マウスに15%パーム油食または13%パーム油食に2%のCLAを添加した食餌を3週間摂取させると、エネルギー摂取量はCLA添加食群で10~12.5%減少し、体重増加量は30~44%減少した²²⁾。この体重減少は睾丸周辺、腎臓周辺白色脂肪組織および肩甲骨間褐色脂肪組織重量の著しい減少を伴い、特に腎臓周辺組織はマウス個体によっては脂肪組織がほとんど消失していた。

食餌CLAの脂肪組織重量減少メカニズムの一つとして、エネルギー代謝を高める効果が挙げられている。このエネルギー消費に関わる因子として脱共役タンパク質ファミリーが考えられる。脱共役タンパク質は先に述べた褐色脂肪組織特異的に発現するUCP1の他、多くの組織で非特異的に発現するUCP2、骨格筋と

褐色脂肪組織に比較的多く発現するUCP3などのアイソフォームが見つまっている。2%CLA添加食で、無添加食と比べ褐色脂肪組織のUCP1とUCP3のmRNA発現量は減少したが、UCP2の発現量は大きく増加した。また、骨格筋でもCLA添加食でUCP2発現量が有意に増加したことから、褐色脂肪組織と骨格筋でのUCP2のmRNA量上昇がCLAのエネルギー消費量増加作用に関与していると考えられた。脂肪組織へのグルコース取り込みを行うGLUT4のmRNA発現量は白色脂肪組織、褐色脂肪組織ともCLAにより50%程度減少した。GLUT4発現量低下による脂肪酸合成基質であるグルコースの脂肪組織内への取り込み抑制も、CLAの体脂肪減少効果の一因であると考えられる。しかしCLA添加食群での骨格筋GLUT4のmRNA発現量には減少が見られず、筋肉でのグルコース利用は妨げない組織特異的なGLUT4発現調節機構が存在すると考えられた。また、CLA添加食を摂取したマウスの白色および褐色脂肪組織ではPPAR γ のmRNA発現量が大きく減少した。PPAR γ は脂肪細胞の分化を促進する転写因子であり、PPAR γ のmRNA発現量減少は脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化とそれに伴う細胞内への脂肪滴の蓄積を抑制すると考えられる。以上の結果からCLA摂取による体脂肪蓄積抑制は、褐色脂肪組織と骨格筋でのUCP2の発現量増加、白色および褐色脂肪組織でのGLUT4とPPAR γ の発現量減少によるものと推察された。

CLA摂取はマウス脂肪組織の著しい減少を引き起こすが、対照的に肝臓の重量を増加させる²⁹⁾。13.5%パーム油食にリノール酸(18:2, n-6)、パルミチン酸(18:0)、CLAをそれぞれ1.5%添加した食餌をICR系雄マウスに摂取させると、体重増加量はパルミチン酸食群でリノール酸食群やCLA食群よりも大きくなったが、肝臓重量はCLA食群で他群よりも2倍程度に増加し、CLA添加食群の体重100g当たりの肝臓脂質量は中性脂肪が他群の約8倍、コレステロールは約3倍、リン脂質は約1.5倍の増加を示した。CLAによる肝臓での脂質蓄積量増加に伴い、脂肪酸合成系酵素の酵素活性とmRNA発現量がリノール酸添加食と比較してそれぞれ2~5倍、1.6~4.5倍増加していた。このことから肝臓での脂質蓄積亢進は、脂肪酸合成の上昇によると考えられた。さらにCLAにより、脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現量を調節するSREBP-1のmRNA発現量も有意に増加した。従ってCLAによる脂肪酸合成上昇はSREBP-1の発現増加に起因すると思われた。興味深いことに、CLAはマウスにおいてアナボリックな代謝系である肝臓脂肪酸合成系を大きく上昇させる一方、カタボリックな代謝系である脂肪酸酸化系も同様に上昇させる²⁹⁾。リノール酸添加食と比較して、CLA添加食は肝臓ミトコンドリアとペルオキシソームのパルミトイルCoA酸化速度を約2.5倍増加させた。脂肪酸酸化系酵素の活性もCLA食によりアシルCoAオキシダーゼで約2.4倍増加したのをはじめ、その他の酵素活性も2倍程度の上昇が見られた。mRNA発現量も、リノール酸添加食群と比べCLA添加食群ではミトコンドリアの脂肪酸酸化系酵素は1.4~2.3倍に、ペルオキシソーム酵素は2.0~2.7倍増加していた。

Petersら²⁴⁾はCLAがPPAR α のリガンド・活性化因子として機能することを報告していることから、CLAはPPAR α を介した経路により脂肪酸酸化系を上昇させる可能性が考えられる。また、CLAは肝臓で不飽和脂肪酸の脱飽和化を行う $\Delta 6$ -および $\Delta 5$ -脱飽和酵素のmRNA発現量も大きく増加させた。両脱飽和酵素はリノール酸を前駆体としてエイコサノイド産生の基質となるアラキドン酸を生成する代謝経路の律速酵素である。このことからCLAによる両脱飽和酵素の発現変化はエイコサノイド産生に影響を与え、エイコサノイドが関与するシグナル伝達経路を介して肝臓脂肪酸酸化系亢進に寄与している可能性もある。

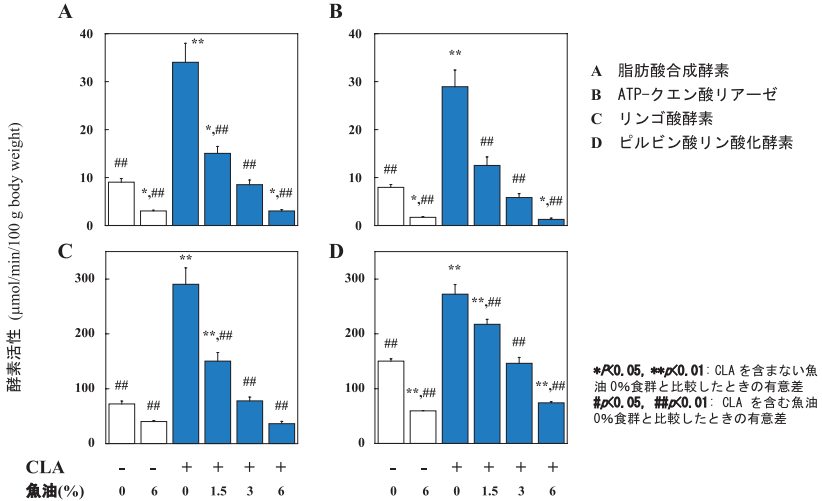
CLA摂取により肝臓脂質濃度は著しく上昇するが、血清中の中性脂肪、コレステロール濃度にはあまり変化が見られない。CLAによる肝臓脂肪酸酸化の増加はVLDLの生成減少、反対に脂肪酸合成上昇はその増加を引き起こすと考えられる。従ってCLAによって脂肪酸酸化と合成が同時に上昇するような条件ではVLDL生成量に大きな変化はなく、よって血清脂質濃度にも影響を与えないと考えられる。

以上の結果からCLAによる肝臓脂肪蓄積は、主に脂肪酸合成の亢進に基づくと考えられた。CLAは脂肪酸酸化を上昇させるが、その程度は肝臓脂肪蓄積を妨げるほどの変化ではないのであろう。CLAによる脂肪酸合成の亢進はSREBP-1が関与するシグナル伝達系を介して行われると推察される。しかしこの脂肪酸合成増加はCLAが直接的にこのシグナル伝達系に影響を与えるというよりも、白色脂肪組織量の大きな減少に起因した二次的な現象である可能性がある。白色脂肪組織はグルコースを脂肪酸に変換して蓄えることにより、全身のグルコース代謝に重要な役割を果たしている。よって、白色脂肪組織の大きな減少はグルコース代謝を遅延させる可能性がある。実際に、CLA添加食を摂取したマウスの血清グルコース濃度はリノール酸添加食あるいはパルミチン酸添加食群と比較して有意に上昇しており²⁵⁾、CLAによってグルコース恒常性が阻害されていることが示唆された。肝臓では主にグルコースが前駆体となり脂肪酸が合成される。従って、CLAによる肝臓での脂肪酸合成増加は脂肪組織の大きな減少に伴うグルコース代謝遅延を補うための補償的代謝応答である可能性がある。

4. これからの食品成分による脂質代謝調節メカニズムの研究

これまでに生体の脂質代謝を調節する因子として数多くの食品成分が発見され、それぞれの生理作用と調節メカニズムが研究されてきた。しかしこれらの研究の多くが特定の食品成分を単独で摂取した場合について検証したものであり、実際にヒトが日常の食生活から摂取する状況と一致するとは言えない。また、摂取する側のヒトでも年齢や性別などによって一人一人が異なる代謝状態を持つことから、同じ食品成分でも全てのヒトに同じ生理作用があるとは限らない。最近、オーダーメイド医療のような個人に適応した処方を提供するシステムの開発が進

図8 共役リノール酸+魚油の肝臓脂肪酸合成系酵素活性の変化



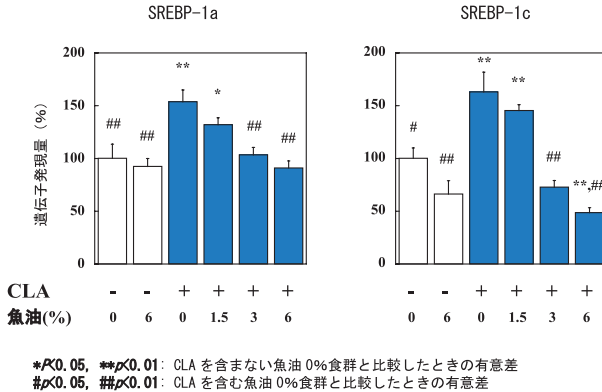
められているが、食生活の分野でも食べる人のライフステージや身体状況に応じて、健康を維持・増進できるような食品や関連する情報を提供できるシステムを創出することが可能になるかもしれない。そのような新しい食品の機能性を探ることを目的とした、これからの食品機能研究の方向性について述べてみたい。

4.1 食品成分の組み合わせ

ヒトは日常の食生活で生理活性のある食品成分を単体で摂るのではなく、複数成分の集合体である食品という形で摂取し、通常、一度の食事でいくつかの食品を組み合わせで食べている。それぞれの食品成分には異なる生理活性があること、また、それらを同時に摂取した場合には食品成分同士で相乗・相加作用、あるいは相殺作用が生じることが考えられる。従って、食品成分の生体への作用をより現実に則して研究するとき、食品を丸ごと摂取することや複数の食品を一緒に摂取することを想定しなくてはならない。このような複数の食品成分を同時に摂取する状況を検討するにあたり、私どもは食品成分を単独で摂取した場合と複数と同時に摂取した場合とは、生体の脂質代謝にどのような影響の違いが生じるのかを検討する研究を進めている。ここではその一例として、共役リノール酸と魚油との組み合わせについて実験した結果を紹介する。

先に述べたように、マウスがCLAを摂取すると白色脂肪組織重量が大きく減少する一方、肝臓脂質の蓄積量は著しく増加する。そこで、肝臓での脂肪酸合成系酵素のmRNA発現量を強く抑制する作用がある魚油をCLAとともに食餌に添

図9 共役リノール酸+魚油のSREBP-1遺伝子発現量の変化



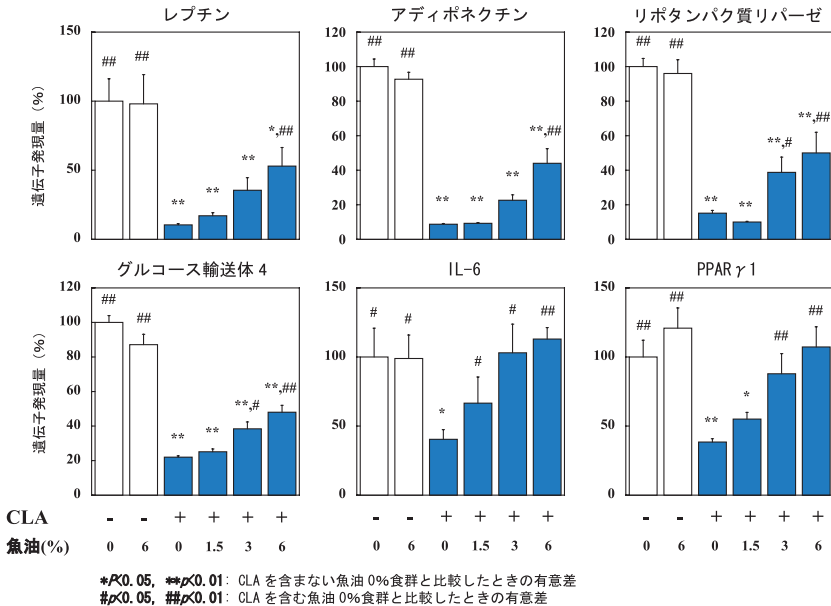
加したとき、肝臓脂質濃度や脂質合成系酵素活性およびmRNA発現量、血清中脂質濃度、脂肪組織での脂質代謝関連遺伝子発現量にどのような影響が見られるか観察した²⁵⁾。リノール酸1.5%を含みパーム油で総脂肪含量を15%に合わせた食餌(CLA無添加食)を摂取したマウス群と比較して、この食餌に含まれるパーム油のうち6%を魚油で置換した食餌を摂取した群との間には白色脂肪組織重量の差はなかったが、1.5%のリノール酸をCLAに置き換えた食餌群ではCLA無添加食群と比べて大きな(75~90%)白色脂肪組織の減少が観察された。しかし、CLA含有食に魚油を1.5、3あるいは6%添加すると量依存的に脂肪組織重量が増加し、CLAによる体脂肪減少作用が緩和された。CLA無添加食に魚油を添加しても肝臓重量に差は見られなかった。CLA添加により肝臓重量と肝臓の中性脂肪とコレステロールのレベルは大きく増加するが、魚油の同時添加はその量に依存してこれらの値を低下させた。魚油がCLAによる肝臓脂質濃度増加を抑制するメカニズムを検討するため、CLAによる脂質濃度増加の第一の要因と見られる肝臓での脂肪酸合成系酵素活性とmRNA発現量の変化を調べた。CLAにより著しく増加した脂肪酸合成系のこれらのパラメーターは魚油添加により低下した(図8)。同時に、脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現量を調節するSREBP-1のmRNA発現量も魚油により減少した。さらに、SREBP-1のアイソフォームであるSREBP-1aとSREBP-1cとを比較すると、後者で魚油による発現量の抑制が大きく(図9)、SREBP-1cが肝臓の脂肪酸合成系を制御する主要な転写因子であることが示唆された。一方、肝臓脂肪酸酸化系については、CLA無添加食に魚油を添加した群では酵素活性ならびにmRNA発現量は上昇するのに対し、CLA添加食に魚油を添加したものでは明確な上昇は認められなかった。従って魚油がCLAの肝臓脂質濃度上昇を抑制する効果は、脂肪酸合成の阻害が主要な要因と考

えられた。

魚油はCLAによる著しい体脂肪減少を緩和する。この効果を、睪丸周辺白色脂肪組織での代謝を制御するタンパク質のmRNA発現量変化をパラメーターとして検討した²⁵⁾。前述の実験²³⁾結果と一致して、レプチン、GLUT4、PPAR γ のmRNA量はCLA無添加食と比較してCLA添加食群で著しく低下し、加えてLPL、アディポネクチン、IL-6など様々な遺伝子の発現量も低下することが観察された。しかしいずれも魚油を同時添加することにより、CLA無添加食群での発現量の50-110%程度にまで回復した(図10)。一方CLA無添加食に魚油を添加した食餌では、これらのmRNA発現量には変化が見られなかった。また、IL-6は脂肪細胞の分化誘導を阻害すること²⁶⁾、さらにマウスでIL-6の産生量増加は脂肪組織量の減少と肝臓脂質合成増加を引き起こすことが報告されている²⁷⁾。しかし我々の実験では、CLA添加によって脂肪組織のIL-6のmRNA発現量が減少し、魚油の同時摂取により発現量が増加したため、IL-6が脂肪組織量の調節に関与するとする仮説とは一致しない。CLAと魚油による脂肪組織量調節作用を明らかにするには、別のメカニズムについても検討しなければならない。

以前の実験で、CLA食によって血清グルコース濃度とインスリン濃度が上昇することが観察されている^{23,25)}。本実験ではCLA無添加食に魚油を6%添加して

図10 共役リノール酸+魚油の脂肪組織での遺伝子発現量変化



も血清グルコース濃度に変化は見られなかった。CLA食に魚油を1.5または3%添加するとCLAだけを添加した群と比べて血清グルコース濃度は上昇するが、魚油添加量を6%に増やすとCLA無添加食と同程度のレベルに減少した²⁵⁾。血清グルコース濃度を調節するインスリンについても測定したところ、グルコース濃度と同様にCLA食に魚油を1.5あるいは3%添加するとCLAによるインスリン上昇効果は促進されたが、魚油添加量を6%にするとCLA無添加食と同等のレベルになった。先の実験で²⁶⁾、CLA摂取により肝臓での脂肪酸合成が上昇し脂質蓄積濃度が増加する原因は白色脂肪組織が著しく減少しグルコース恒常性が失われるためだと仮説を立てたが、CLA添加食に魚油を同時添加するとその量の増加につれ脂肪組織量が回復し、インスリン抵抗性や高グルコース血症が改善した。従って白色脂肪組織は全身のグルコース代謝を調節に関与し、脂肪組織の著しい減少などによりその機能が失われると肝臓が血清中の余剰グルコースから脂質を合成してグルコース恒常性を保とうとするメカニズムが働くかと推察された。

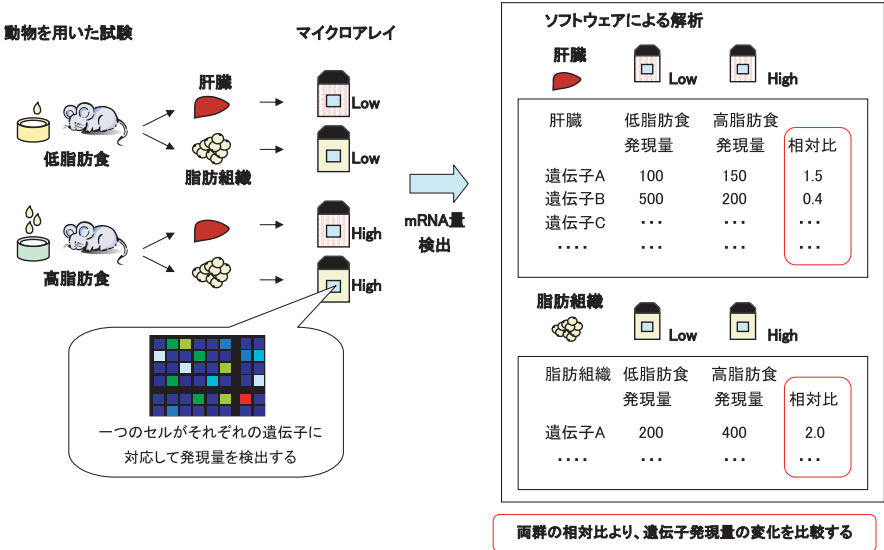
4.2 食品成分による脂質代謝制御機構の新しい研究方法：DNAマイクロアレイを用いたニュートリゲノミクス研究

脂質代謝を制御する食品成分についてはこれまで数多く紹介されているが、食品を摂取するヒトの側から考えると、性別、年齢、人種、体質、疾患の有無、生活様式などの違いにより、食品成分に対する感受性が個人で異なることが考えられる。よって、同じように食品成分を摂取しても個人によって有効に作用する場合もあれば、全く作用を示さない場合、あるいは逆にマイナスの作用を示す場合もあると思われる。また、このような食品成分のプラス効果を期待したサプリメントや食品が多く市販され手軽に摂取できるようになったが、実際どれくらい摂取すれば生体に好影響を及ぼすのかは個人によって異なってくるであろう。食への関心がますます高まる現代において、人々は健康を保ち気になる症状を改善するための情報を次々と手に入れているが、それらを実践することは誰にとっても安全で効果があるのかどうかは確実でない。

このような食品成分の作用の多様性、摂取する側の多様性に対応した研究分野として、ニュートリゲノミクスと呼ばれる新しい領域が作られている。栄養(nutrition)とゲノム科学(genomics)を合わせた造語で、様々な臓器や組織で発現する数万もの遺伝子に対して、生体が摂取した食品成分がどのような発現変動を与えるかを計測することにより、どのような生理作用を発現するかを予測するものである。この数万もの遺伝子発現量を解析するのに使われるのがDNAマイクロアレイと呼ばれるツールである。DNAマイクロアレイとはDNAチップとも呼ばれ、ガラスなどの担体上にさまざまな遺伝子配列由来のオリゴヌクレオチドあるいはcDNA断片を高密度に配置し固定化したものの総称である。DNAマイクロアレイを用いることにより、数千から数万の遺伝子の発現変化を一度の実験

図11 DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析のモデル

例:高脂肪食と低脂肪食での比較



で網羅的に解析することが可能になった。一度の実験で多数の遺伝子発現を解析できるため、食品成分の種類や量、組み合わせを変えた研究や、食品成分を摂取する対象のコンディションを変えた研究にも対応し、それぞれの条件間での比較も容易になる。

食品成分の作用は直接ヒトで検証するのが一番確実であるが、安全性や倫理面で問題があるため、一般的には実験動物や細胞などをモデルとして用いるのが現実的である。DNAマイクロアレイを用いた食品成分の生体への作用性を解析する研究として、ここではラットが低脂肪食あるいは高脂肪食を摂取したとき、脂質代謝が盛んな肝臓と脂肪組織で発現する遺伝子にどのような差が現れるかを検討するときの例を示す(図11)。それぞれの食餌を一定期間摂取させた動物の肝臓や脂肪組織より抽出したRNAを用いて、その臓器で発現しているあらゆる遺伝子のmRNA量をDNAマイクロアレイで測定し、食餌群間での差を比較する。DNAマイクロアレイを用いることで数千から数万の遺伝子の発現量をスクリーニング的に一度に解析でき、発現量に変化が見られたものはその遺伝子名と機能をデータベースから検索して、それら遺伝子の働きから食事の脂質含量の違いによる生理作用として推定できる。

各食品成分がヒトではどのような作用を示すかは、動物実験の結果からある

程度類推することは可能であっても、動物実験の結果をそのままヒトに当てはめることはできない。ヒトを対象としたときの食品成分の影響を調べる場合、採取時に生体へのダメージを最小限に留めることができる血液や尿などのサンプルを用い、生化学的分析値、一部の遺伝子やタンパク質の発現量、酵素活性の変動から食品成分の作用を推定するに留まる。動物や細胞を用いた実験ではヒトでは採取も難しい生検サンプルが得られ、DNAマイクロアレイを用いることでより多くの遺伝子発現量の変動を捉えて食品成分の作用性を広く観察することができるため、広範な代謝系への影響を検討することが可能である。動物や細胞実験ではDNAマイクロアレイの解析と併せて従来の生化学的分析なども実施し、これらのデータを蓄積することで、動物や細胞モデルでの機能性とヒトでの機能性に相関性が見出され、ヒトでの食品成分の作用性をより正確に推定することができるようになる。またDNAマイクロアレイの利用により、これまで知られていなかったバイオマーカーの開発にも役立てることができると期待される。

5. おわりに

食品に含まれる機能成分とその作用性について、ここ数十年の間に多くの物質や作用メカニズムが解明されてきており、数々の機能性食品の開発や消費者へ食と健康を考えるための情報提供に役立てられてきた。脂質代謝の制御に関わる食品成分についても、肥満をはじめとした心疾患や糖尿病などの深刻な生活習慣病の予防に有効であると大いに注目を集めている。しかし食の情報が氾濫する現代では、健康維持に有効な食品成分はどれくらい、どの食品からどのようにして摂ればいいのか、結局どうすれば一番いいのか、など混乱があるのが現状である。また、必要かつ十分な栄養素や機能性成分の量はライフスタイルの多様化や個人の特性があることから、それぞれのヒトで異なるはずである。さらに、健康の維持や増進のためにと特定の栄養素や成分を過剰に摂取する人、好きなものは好きなだけ食べて足りないと思う栄養素はサプリメントで補えばいいという考え方、または忙しすぎて食事に手間がかけられないと適当に済ませてしまうなど、食事そのものをおろそかにしているケースも多く見受けられる。本来、食事は人間の本能的な欲求を満たすものであるとともに、生活の中で大きな楽しみとして占めるはずのものである。政府は食育基本法を制定し、国民一人一人が「食」について意識を高め、『自然の恩恵や「食」に関わる人々の様々な活動への感謝の念や理解を深めつつ、「食」に関して信頼できる情報に基づく適切な判断を行う能力を身に付けることによって、心身の健康を増進する健全な食生活を実践するために、今こそ、家庭、学校、保育所、地域等を中心に、国民運動として、食育の推進に取り組んでいくこと（食育基本法附則より）』を、国を挙げて実行に取りかかっている。食品成分の機能性研究もこのような流れに沿って、食品に含まれる成分の重要性だけでなく、食品や食事そのものが持つ魅力と機能性を明らかにし

て、全ての人が十分理解し健康増進に役立てていただけるように努力しなければならぬと感じている。

(食品機能部 栄養化学研究室 高橋 陽子)

引用文献

- 1) Murray, R. K. et al.: Harper's Biochemistry 22nd edition, Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1990
- 2) 井手隆: 化学と生物 32:106-113, 1994
- 3) 井手隆: 日食工誌 48:555-563, 2001
- 4) Pegorier J. P., Le May C., Girard J.: *J. Nutr.* 134:2444S-2449S, 2004
- 5) Horton J. D., Goldstein J. L., Brown M. S.: *J. Clin. Invest.* 109: 1125-1131, 2002
- 6) 井手隆: 化学と生物 37:443-450, 1999
- 7) Lee C. H., Olson P., Evans R. M.: *Endocrinology* 144:2201-2207, 2003
- 8) Klierer S. A. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 239-263, 2001
- 9) 井手隆, 高橋陽子: 農業および園芸 74:264-276, 1999
- 10) Fruhbeck G. et al.: *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E827-E847, 2001
- 11) 杉浦甫, 船津丸貞幸, 渡辺恵子: *Molecular Medicine* 36:236-242, 1999
- 12) 川田照雄, 杉本悦郎: 実験医学 14:2209-2214, 1996
- 13) Ide T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1485:23-25, 2000
- 14) Kim H. J., Takahashi M., Ezaki O.: *J. Biol. Chem.* 274:25892-25898, 1999
- 15) Yoshikawa T. et al.: *J. Biol. Chem.* 277:1705-1711, 2002
- 16) Forman B. M, Chen J., Evans R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4312-4317, 1997
- 17) Takahashi Y., Ide T.: *Br. J. Nutr.* 84:175-184, 2000
- 18) Takada R., Saitoh M., Mori T.: *J. Nutr.* 124:469-474, 1994
- 19) Kumamoto T., Ide T.: *Lipids* 33:647-654, 1998
- 20) Takahashi Y., Ide T., Fujita H.: *Comp. Biochem. Physiol. B* 127:213-222, 2000
- 21) Chin S. F. et al.: *J. Food Comp. Anal.* 5:185-197, 1994
- 22) Takahashi Y. et al.: *Comp. Biochem. Biophys. B* 133:395-404, 2002
- 23) Takahashi Y. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1631:265-273, 2003
- 24) Peters JM et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1533:233-242, 2001
- 25) Ide T.: *Diabetes* 54:412-423, 2005
- 26) Lagathu C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:372-379, 2003
- 27) Metzger S. et al.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:E957-E965, 2001

食品成分による炎症・アレルギーの抑制

—果実および果実に含まれるフラボノイドの炎症・アレルギー抑制効果—

1. はじめに

近年、花粉症やアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性炎症疾患の罹患者は増加の一途をたどっており、厚生労働省の統計によれば、現在では日本人の1/3は何らかのアレルギー様症状を持っていると考えられるなど（図1）、大きな社会的問題となっている。

しかし、この統計から見られるように、症状があっても医療機関への受診をしない患者も多く、食事やサプリメントによりアレルギーの症状を抑えたいという要求が強いことから、アレルギー症状を抑制する作用を有する食品（抗アレルギー食品）に対する需要は高いと考えられる。

アレルギーは、元来、生体を防御するための抗原抗体反応に基づく免疫応答であるが、そのなかでも生体に過剰な傷害を与える応答をアレルギーと呼んでいる。アレルギー反応は、古くからその機序に基づくCoombs&Gellの分類（表1）により分けられている。この中でも狭義のアレルギーとして扱われるIgE抗体依存性の即時型アレルギー反応（I型アレルギー）を対象とした抗アレルギー活性の研究が最も進んでおり、甜茶やシソ¹⁾をはじめとするヒスタミン遊離阻害活性を有する食品成分が報告されている。

また、アレルギーは炎症反応の一種、つまりアレルギー反応により起きた炎症がいつまでも継続しているという慢性的炎症状態として捉えることができる。そ

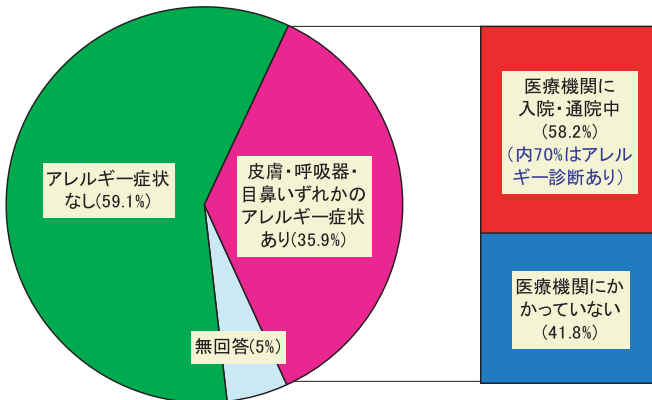


図1 アレルギー様症状の有無とその診断割合
（平成15年度 厚生労働省保健福祉動向調査概況より作成）

表1 Coombs&Gellによるアレルギー反応の分類

アレルギーの型	反応のメカニズム	疾患の例
I型(即時型・アナフィラキシー型)	抗原の進入に対して産生されたIgE抗体がマスト細胞や好塩基球に結合した状態で、再度アレルギーが進入した際にヒスタミン等のメディエータが遊離	アナフィラキシー・急性じんましん
II型(細胞障害型)	自己の細胞膜成分に対するIgGやIgEなどの抗体を介して、炎症細胞や補体の作用により細胞が融解する	自己免疫性溶血性貧血・血液型不適合輸血・重筋無力症
III型	可溶性抗原と抗体の反応により形成された免疫複合体が炎症細胞や補体により攻撃を受けて起きる	全身性エリスマトーデス・関節リウマチ・膠原病などの自己免疫疾患
IV型(遅延型)	抗原の再侵入の際に感作されたT細胞が遊走し、炎症を起こす	接触性皮膚炎・ツベルクリン反応

ここで、我々は、炎症そのものを抑制することにより、アレルギーの症状を抑制、緩和することができると考え、炎症抑制活性を有する食品の探索を行った。

炎症は、外界からの様々な刺激によって引き起こされる組織傷害に対する生体防衛反応と定義されており、その初期には図2に模式図として示したような反応が認められる。例えば、炎症初期の血管透過性亢進期には、外界からの刺激を受けた肥満細胞からのヒスタミン等の遊離を通じて、血管拡張や血管透過性の亢進が起こり、それに引き続き好中球やマクロファージのような炎症細胞が炎症局所へ浸潤する。

これらの白血球は活性化を受け、アラキドン酸代謝物（プロスタグランジン (prostaglandin:PG)、ロイコトリエン (leukotriene:LT) 等) や活性酸素 (O_2^- 、 $OH\cdot$ 、 H_2O_2 等)、あるいはサイトカインのような種々のケミカルメディエータの産生が誘導される。このように、炎症初期には様々な細胞、並びにそれらの産生するケミカルメディエータ等が複雑に絡み合った反応が起きている。

そこで、炎症反応の制御においては、これらのケミカルメディエータの動態を把握することが重要であり、特に PGE_2 は他のメディエータの作用を増強し、炎症の進展に寄与していることが分かっている。また、白血球が炎症局所へ浸潤するためには、血管内皮細胞表面への白血球接着分子の発現が必須である。そこで、今回、炎症抑制活性成分の探索において、ラット炎症性腹腔マクロファージを用いた PGE_2 の産生、およびヒト臍帯静脈内皮細胞における白血球接着分子の発現の2つを指標として用い、果実およびそれらに含有されるフラボノイドについて、抑制活性を有する成分の探索を行った。

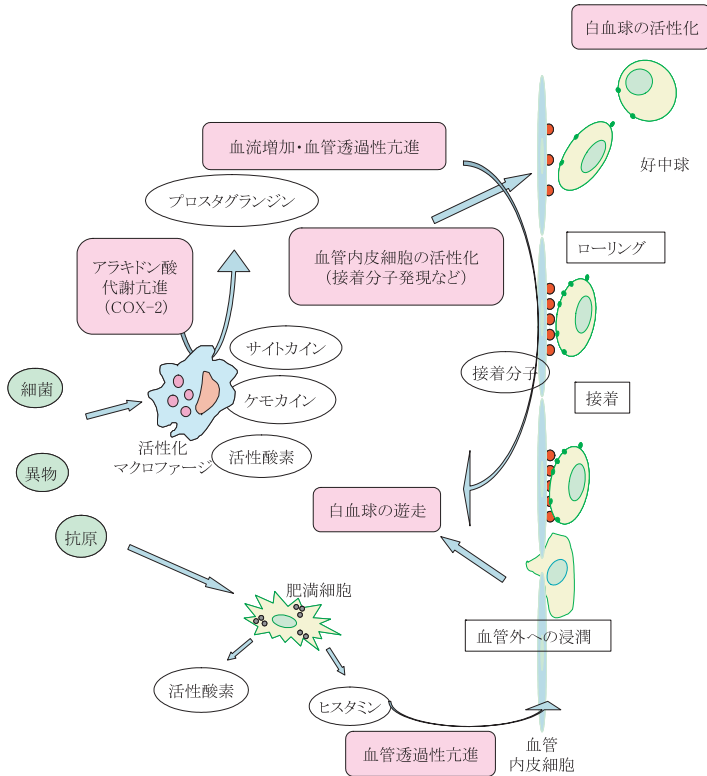


図2 炎症初期に起こる生体防御反応（模式図）

2. ラット炎症性腹腔マクロファージのPGE₂産生に対するフラボノイドの効果

プロスタグランジン類は、細胞膜リン脂質の第2位からホスホリパーゼA₂により遊離されたアラキドン酸から生成される。このとき、律速となる酵素が脂肪酸シクロオキシゲナーゼ（COX）である。COXには、常在型のCOX-1および誘導型のCOX-2と呼ばれる2種類のアイソザイムが存在する。COX-1から産生されるPGは、血管拡張や胃粘膜の保護等の働きを持ち、生体の恒常性に重要な役割を果たしているのに対し、COX-2から産生されるPGは炎症局所等において、生体防御に関与する。そのため、COX-2を選択的に阻害することができれば、副作用のない抗炎症薬として有効と考えられる。

そこで、ラット炎症性腹腔マクロファージを用い、大腸菌リポ多糖により誘導されたPGE₂産生に与える効果について、果実およびフラボノイドとその類似化合物を用いて検討した。

表2 供試果実の一覧 (太字は2次スクリーニングにも使用)

核果類	モモ(2種)・スモモ・ブルーン・オウトウ・アンズ・ヤマモモ(2種)・ウメ 2種)
仁果類	リンゴ(3種)・カリン・ピワ・ナシ・クラブアップル・サイダーアップル
種実類	クリ・ギンナン
柑橘類	ウンシュウミカン・タンゴール
液果類	ブドウ
小果樹	フサスグリ(2種)・ラズベリー・ハスカップ・スグリ・クワ・アロニア
その他	カキ・ザクロ・キウイフルーツ・イチジク
熱帯果樹	マンゴー(2種)・ホワイトサボテ・パパイヤ・カニステル・マンゴスチン・アボカド・パイナップル・ピタヤ・タマリロ・ココヤシ・パッションフルーツ・バナナ

1) 果実類のPGE₂産生抑制活性

表2に一次スクリーニングに用いた40種(47品種)の果実をそれぞれの分類ごとに示した。一次スクリーニングにおいては、それぞれの果実を水および80%エタノールで抽出したものを用いた。さらに、一次スクリーニングの結果から、ある程度のPGE₂産生抑制活性が認められた約20種(表中に太字で表示)を選び、用量依存性を調べた。

その結果、ブルーベリーやフサスグリ、リンゴの水抽出物で10~30%程度、ブルーベリーやリンゴのエタノール抽出物では20%前後、PGE₂産生を抑制する効果が認められた(図3,4)。

しかし、低濃度では産生抑制効果を示すにもかかわらず、高濃度にした場合には、逆に産生を増強するものも存在するなど、明らかな用量依存性は認められなかった。

この理由としては、今回試験に用いた試料が粗抽出物であるために、高濃度では増強活性成分が強く作用することや試料採取時のLPS汚染などが原因と考えられた。

2) フラボノイドのPGE₂産生抑制活性

前項の結果により果実類から活性を指標に有効成分を単離することが困難であったことから、果実類に含有されるフラボノイドについて、PGE₂の産生抑制効果を検討することとした。

そこで、39種のフラボノイドおよびその類似化合物、ならびに比較対照として、非ステロイド抗炎症薬(NSAID:Non steroidal anti-inflammatory drug)であるAspirin[®]、およびCOX-2の選択的阻害剤であるNS-398についてもあわせて試験を行った。

表3に試験に用いたフラボノイドの慣用名およびその化学構造式を示した。こ

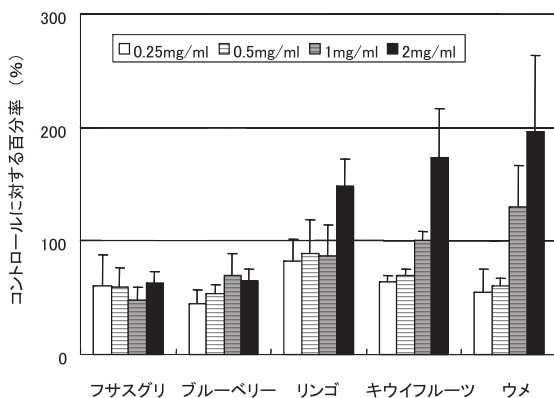


図3 PGE₂産生量に対する果実水抽出物の影響

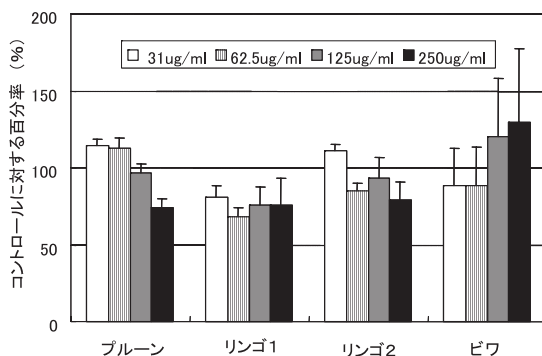


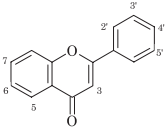
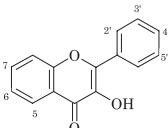
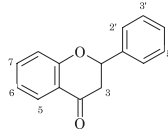
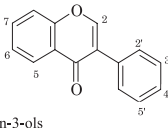
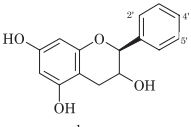
図4 PGE₂産生量に対する果実エタノール抽出物の影響

のうち、抑制活性を有するフラボノイドについては、用量依存的な抑制曲線から算出したIC₅₀ (50%阻害濃度) 値をあわせて示した。

フラボノイドをサブクラス毎に検討したところ、フラボンではluteolinを除く全てに抑制活性が認められた。しかし、フラボノールでは3-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavonol, galangin, kaempferolおよびquercetinの5種類のみが抑制活性を示した。また、quercetinとrutin (quercetin 3-rutinoside) やquercitrin (quercetin 3-rhamnoside) のように、配糖体は対応するアグリコンと比較するとPGE₂産生に対し、やや促進もしくは非常に弱い抑制を示した (データ省略)。

フラバノンにおいても、naringeninやhesperetinのようなアグリコンは抑制活性を有するが、それに対する配糖体、naringin (naringenin-O-7-neohesperidoside)

表 3 Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the various flavonoids tested for the inhibition of PGE₂ biosynthesis in rat peritoneal macrophage stimulated by LPS.

Subclass (Chemical formula)	Name	IC ₅₀ (μ M) ^a	Substitutions		
			OH residues	OCH ₃	Others
	5-Hydroxyflavone	10.6±3.9 ^b	5		
	7-Hydroxyflavone	5.2±2.2 ^b	7		
	Chrysin	2.8±0.4 ^b	5,7		
	Baicalein	2.5±0.9 ^b	5,6,7		
	Apigenin	3.3±2.0 ^b	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	36.3±18.8 ^c	7,3',4'		
	Luteolin	>1000	5,7,3',4'		
	3-Hydroxyflavone	30.6±26.8 ^c	3		
	7-Hydroxyflavonol	10.7±6.6 ^b	3,7		
	Galangin	14.3±2.6 ^{bc}	3,5,7		
	Kaempferol	13.1±1.7 ^b	3,5,7,4'		
	Fisetin	>1000	3,7,3',4'		
	Morin	>1000	3,5,7,2',4'		
	Quercetin	13.9±2.3 ^{bc}	3,5,7,3',4'		
	Isorhamnetin	>1000	3,5,7,4'	3'	
	Rutin	>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
	Quercitrin	>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
	Robinetin	>1000	3,7,3',4',5'		
	Quercetagenin	>1000	3,5,6,7,3',4'		
Myricetin	>1000	3,5,7,3',4',5'			
	Naringenin	7.9±1.9 ^b	5,7,4'		
	Naringin	>1000	5,4'		7-neohesperidoside
	Eriodictyol	7.2±1.7 ^b	5,7,3',4'		
	Hesperetin	8.4±1.3 ^b	5,7,3'		4'
	Hesperidin	>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
		Daidzein	37.6±14.3 ^c	7,4'	
Daizin		>1000	4'		7-glucoside
Genistein		7.2±2.3 ^b	5,7,4'		
Genistin		>1000	5,4'		7-glucoside
		(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'	
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	Epigallocatechin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
	Epicatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4'		3-gallate
	Epigallocatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4',5'		3-gallate
Other compounds	Chlorogenic acid	>1000			
	Cyanidine chloride (anthocyanin)	>1000			
	Phloretin (dihydrochalcone)	>1000			
	Phloridin	>1000			
	Resveratrol (Stilbene)	7.6±1.9 ^b			
	COX-2 selective inhibitor	NS-389	<0.1 ^a		
NSAID	Aspirin	2.9±2.1 ^b			

^aThe values of IC₅₀ were analyzed by Fisher's PLSD test.

やhesperidin (hesperetin-*O*-7-rutinoside) では、抑制活性は認められなかった。イソフラボンでは、genisteinの方がdaidzeinに比べIC₅₀で約5倍の強い抑制活性を示したが、それぞれの7-*O*-glucoside配糖体であるgenisteinおよびdaidzeinでは、全く抑制活性が認められないか、逆に増加の傾向が確認された。ResveratrolおよびCOX阻害剤であるAspirin[®]およびNS-398では強くPGE₂産生を抑制したが、実験に用いたその他のフラボノイド、例えばフラバン-3-オール (catechin, epicatechin, epigallocatechin他) やアントシアニン、またその類似化合物ではLPS誘導によるPGE₂産生抑制活性は認められなかった。

IC₅₀で比較した場合、フラボンおよびフラバノンはLPS誘導によるPGE₂産生に対し、最も強い抑制効果を示し、その数値は2.5-36.3μMの範囲であった。次いで活性の高いグループはフラボノールであり、その数値は10.7-30.6μMの範囲であった。また、イソフラボンでは、その値は7.2-37.6μMと広範囲に分布した。スチルベンに属するresveratrolのIC₅₀およびその阻害曲線はgenisteinのそれに非常に良く類似していた。Aspirin[®]やNS-398では、非常に強い抑制を示し、それぞれのIC₅₀は2.9μMおよび0.1μM以下であったが、一部のフラボノイドではAspirin[®]に準ずる阻害活性を示した。

3) プロスタグランジン産生抑制活性とCOX-2発現量

以上のように、いくつかのフラボノイドにおいてPGE₂産生抑制活性が明らかになったことから、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、COX-2蛋白質の発現との関係を調べるために、COX-2蛋白質のウエスタンブロットを行った結果を図5に示した。

強い産生抑制活性を有するグループに属するapigenin, 7-hydroxyflavonolおよびeriodictyolはCOX-2蛋白質の発現が常在型のアイソザイムであるCOX-1に比べ、抑制されることが確認された。例えば、apigeninにおけるCOX-2/COX-1比は0.4μMから40μMの濃度の範囲で2.8から0.1と用量依存的に低下していた。同様に7-hydroxyflavonolおよびeriodictyolにおいてもそれぞれ1.7から0.4, 10.0から5.0と低下していた。それに対し、PGE₂産生抑制の弱いグループに属するdaidzeinでは、COX-2蛋白質の発現抑制効果は弱く、COX-2/COX-1比は2.8から11.0であった。

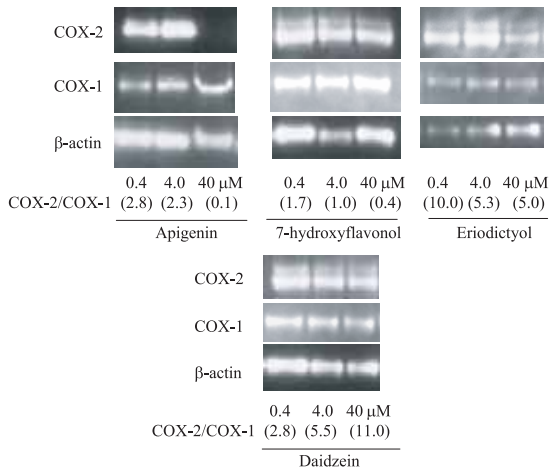


図5 Western blot analysis of COX-1, -2 in rat peritoneal macrophages.
(Upper part: strongly suppressive flavonoids,
Lower part: lesser effective flavonoid)

Activated peritoneal macrophages were collected from soluble starch and bacto-peptone injected SD rats. Macrophages were incubated with several concentrations of flavonoids for 14 h in the presence and absence of 1 μg/ml of LPS as stimulator.

After washing, the cells were lysised. The cell lysates were analyzed by Western blot as described in Materials and Methods.

3. ヒト臍帯静脈内皮細胞における白血球接着分子E-selectin発現に対するフラボノイドの効果

次に、抗炎症作用探索のための指標として白血球浸潤に着目し、その抑制についての検討を行った。炎症反応は、先に述べたように血管透過性の亢進、それに引き続く白血球の炎症局所への浸潤、そして治癒という3つの過程に大きく分けることができる。アレルギー性炎症や慢性炎症においては、血管透過性の亢進と白血球の浸潤が、白血球から遊離される走化因子等により、繰り返り起こっていると考えられる。つまり、炎症局所への白血球遊走がこの複雑な反応の制御を担っていると言っても過言ではない。

白血球の炎症局所への遊走は、いくつかの過程を経て起こる。最初に、生体が何らかの刺激を受けると、血管内を血流に沿って流れている白血球は血管壁付近を流れるようになり、次に血管内皮細胞表面を転がる現象が起こる。この現象をローリング (rolling) と呼んでいる。次に、白血球は内皮細胞表面に接着 (adhesion) し、内皮細胞間を通過した後、血管周囲の結合組織を通り、最後に炎症局所に向かって移動していく。浸潤の初めの段階であるローリング反応には、接着因子であるselectin familyと呼ばれるP-selectin (CD62P), L-selectin

(CD62L) およびE-selectin (CD62E) というレクチンに類似した糖鎖構造を持つ Ca^{2+} 依存性の蛋白が関与する。これらのselectinのうち、L-selectinは恒常的に白血球の細胞表面に発現している。それに対し、P-selectinは血小板の α -顆粒内および血管内皮細胞のWeibel-Palade小体に不活性型で存在し、E-selectinは通常、発現していない。腫瘍壊死因子(TNF)- α やIL(Interleukin)-1のような炎症性サイトカインは、まずP-selectin分子を活性化して内皮細胞の表面に発現させ、それに引き続きE-selectinの発現を誘導することが知られている。

このローリング反応は、白血球の血管外浸潤と炎症局所への集積に必須であり、野菜や果実等植物由来のいくつかのフラボノイドで、内皮細胞表面の接着分子発現を抑制することが報告されている。このことから、接着分子の発現抑制により、白血球の浸潤を減少させ、抗炎症や抗アレルギーにつながれるものと期待される。また、フラボノイド等の機能性成分が吸収され、血中に移行した場合、最初に作用する細胞は血管内皮細胞であると考えられることから、TNF- α により惹起されたヒト臍帯静脈内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) 表面におけるE-selectinの発現に対する効果を検討することとした。

1) 果実類の白血球接着分子発現に対する効果

前項と同様に約40種の果実の水およびエタノール抽出物について、白血球接着分子発現に対する効果を検討したが、抑制活性を有するものは認められなかった。

2) 白血球接着分子発現に対するフラボノイドの効果

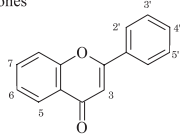
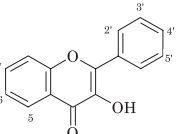
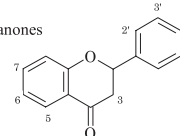
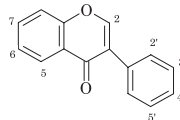
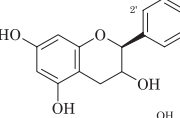
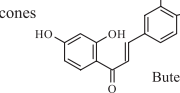
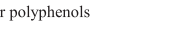
本実験に用いたフラボノイドの化学構造および慣用名を表4に示した。TNF- α 刺激による白血球接着分子E-selectin発現において、フラボンに属するluteolinとapigeninは、もっとも強い抑制活性を示し、 IC_{50} はそれぞれ0.7および1.1 μM であった。次に抑制活性の強いグループとしては、fisetin (0.8 μM), quercetin (4.5 μM) およびkaempferol (4.3 μM) などのフラボノール、さらにchalconeに属するbutein (1.5 μM) が挙げられる。イソフラボンとフラバノンの上の3つのサブクラスよりもやや活性が弱く、genistein (13.8 μM), eriodictyol (70.6 μM) であったが、それ以外のフラボノイドでは全く発現抑制活性を示さないか、非常に弱かった。

4. 果実類およびフラボノイドの炎症抑制活性と作用機序

1) 果実類の炎症抑制活性

カンキツ(特に果皮)は、果実類の中でも高い炎症抑制活性を示すことが知られている。そこで、落葉果樹を中心に、熱帯・亜熱帯果樹を含め40種の果実の抗炎症作用を調べたところ、フサスグリやブルーベリーなどの小果樹類の水抽出物やプルーン・リンゴなどのエタノール抽出物に PGE_2 産生抑制活性が認められた。

表 4 Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the various flavonoids tested for the inhibition of E-selection expression in HUVECs stimulated by TNF- α .

Subclass (Chemical formula)	Name	IC ₅₀ (μ M)	Substitutions		
			OH residues	OCH ₃	Others
Flavones 	5-Hydroxyflavone	>1000	5		
	7-Hydroxyflavone	>1000	7		
	3-Methoxyflavone	>1000		3	
	3',4'-Dihydroxyflavone	>1000	3',4'		
	Chrysin	>1000	5,7		
	Baicalein	>1000	5,6,7		
	Apigenin	1.1 \pm 0.3	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	>500	7,3',4'		
	Luteolin	0.7 \pm 0.04	5,7,3',4'		
Flavonols 	3-Hydroxyflavone	>1000	3		
	7-Hydroxyflavonol	>1000	3,7		
	Galangin	>1000	3,5,7		
	Kaempferol	4.3 \pm 1.1	3,5,7,4'		
	Fisetin	0.8 \pm 0.2	3,7,3',4'		
	Morin	>1000	3,5,7,2',4'		
	Quercetin	4.5 \pm 1.0	3,5,7,3',4'		
	Isorhamnetin	>1000	3,5,7,4'	3'	
	Rutin	>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
	Quercitrin	>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
	Robinetin	>1000	3,7,3',4',5'		
	Quercetagenin	>1000	3,5,6,7,3',4'		
	Myricetin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
Flavanones 	Naringenin	>500	5,7,4'		
	Naringin	>1000	5,4'		7-neohesperidoside
	Eriodictyol	70.6 \pm 50.3	5,7,3',4'		
	Hesperetin	>1000	5,7,3'	4'	
	Hesperidin	>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
Isoflavones 	Daidzein	>1000	7,4'		
	Genistein	13.8 \pm 6.5	5,7,4'		
	Formononetin	>1000	7	4'	
	Biochanin A	>1000	5,7	4'	
Flavan-3-ols 	(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
Chalcones 	Phloretin	>1000			
	Butein	1.5 \pm 0.2			
Other polyphenols 	Chlorogenic acid	>1000			
	Resveratrol	>500			

しかし、今回は粗抽出物を用いた試験であったため、用量依存的な抑制傾向は明らかではなかった。

また、血管内皮細胞における白血球接着分子の発現を抑制する果実は認められなかった。

2) フラボノイドの炎症抑制活性と作用機序

2) - 1 フラボノイドのPGE₂産生抑制活性

フラボノイドの構造とPGE₂産生抑制効果について構造活性相関を中心に検討を行った。

フラボノイドはフラボノイド骨格と呼ばれるA, B, Cの3環からなる構造を有し、骨格上の違いによりサブクラスに分類されている。また、表3に示したように、様々な位置に水酸基の配位が見られ、さらにその誘導体が存在する。本実験に用いたフラボノイドのうち、フラバン-3-オールおよびアントシアニンに属するものにはLPS刺激マクロファージにおけるPGE₂産生抑制効果は認められず (IC₅₀で1000μM以上)、その他のフラボンやフラボノール、フラバノール等にはのみ抑制が認められた。このことから、PGE₂産生抑制活性を示すためには4位のケトン基(オキソ構造)が必須であること、またC2-C3位における二重結合は抑制活性を強めることが明らかになった。Landolfiらは、フラボノイドのC2-C3の二重結合が欠けると脂肪酸シクロオキシゲナーゼ経路によるPGE₂産生抑制活性が低下することを報告²⁾している。本試験のラット炎症性腹腔マクロファージにおけるPGE₂産生抑制に関する結果においても、有意差は認められないものの、同様の傾向が確認された。

フラボノイドのPGE₂産生抑制活性は、水酸基の位置や数にも影響を受けており、例えば、A環の5位と7位の水酸基は大きな影響を与えることが明らかになった。今回抑制活性を示したフラボノイドでのIC₅₀の比較によれば、5, 7位の両方に水酸基を有するフラボノイドは、7位のみ、もしくはいずれの水酸基も持たないものに比べ、有意に高い抑制活性を示した。また、5位に水酸基を持たないイソフラボンよりも水酸基を有する方が高い活性を示した。また、フラボンとフラボノールでは、B環の水酸基も活性に強く関わり、3', 4'位に水酸基を持つものよりも、水酸基を持たないものの方が高い活性を示した。また、2', 4'位や3個以上の水酸基を有するフラボノイドは、全く活性を示さなかった。MutohらはCOX-2の転写活性に対するフラボノイドの構造活性相関を検討し、5位および7位の水酸基での電子密度が低いほど抑制活性が強いことを示し³⁾、本試験とほぼ同様の結果を得ていることから、フラボノイドの構造とPGE₂産生抑制活性の関係は、これらの電子密度への影響から推測できる可能性がある。

また、Kalkbrennerらは単離したCOX酵素の活性阻害とフラボノイドの構造について、平面構造をとらないフラボノイド(catechin, epicatechin)の方が、

平面構造をとるフラボノイド (galangin, quercetin等) よりも抑制活性が強いとしており⁴⁾, この点では本試験と異なる結果を示している。しかし, フラボンにおけるB環の*o*-ジフェノール構造やフラボノールにおけるA環5, 7位の水酸基の抑制活性への影響については同様の結果であることから, 細胞刺激による結果と単離された酵素活性阻害では若干の差異は認められるものの, フラボノイドのPGE₂産生抑制活性についてはかなり類似した結果が得られた。

2)ー2 フラボノイドのPGE₂産生抑制作用機序

フラボノイドの抑制作用機序については, resorcin構造を有するフラボノイドであるquercetin, kaempferol, genisteinやresveratrolが大腸がん細胞において, COX-2プロモーター活性を抑制する効果が確認されており⁵⁾, 本実験においても, これらのフラボノイドは高いPGE₂産生抑制効果を示した。この結果より, フラボノイドのPGE₂産生抑制活性は, LPS刺激マクロファージでのCOX-2プロモーター活性抑制に起因する可能性が示唆された。

また, COXは酸素添加酵素であることから, フラボノイドの抗炎症活性が抗酸化活性に由来する可能性があると考えられた。例えば, フラボノイドのラジカル消去活性は良く知られているが, LPSシグナルによって誘導されるNF- κ Bの活性化がラジカル消去能を有する化合物により抑制されることが報告されている⁶⁾。また, フラボノイドのラジカル消去活性には, B環の3', 4'位に配位した水酸基が非常に重要な働きを示すとされている⁷⁾。しかし, 本実験においては, 前述のようにB環の水酸基を持たない方が3', 4'位に水酸基を持つものより活性が高いことから, フラボノイドの抗酸化活性がPGE₂産生に関与する可能性はあまり大きくないと考えられた。

さらに, quercetin, genistein, apigeninおよびresveratrol等のフラボノイドはチロシンキナーゼ蛋白発現阻害を有することが報告されている⁸⁾が, この酵素は, シグナル伝達において大変重要な役割を持つことから, これらのフラボノイドの示す強いPGE₂産生抑制活性が, LPS由来のチロシンキナーゼシグナル伝達系を介したCOX-2蛋白発現阻害によるものである可能性もある。本実験において, スチルベンに属するresveratrolのPGE₂産生抑制活性はgenisteinに匹敵するIC₅₀を示しており, resveratrolの示すPGE₂産生抑制効果の一部が, チロシンキナーゼ阻害に由来すると考えられた。また, フラボノイドの一種であるwogonin (5, 7-dihydroxy-8-methoxyflavone) は, 皮膚炎症の亜急性期にCOX-2のmRNA誘導を抑制したり, 急性炎症時のPGE₂含量の増加を抑制することが報告されている⁹⁾。これらの結果から, 特定のフラボノイドでは炎症反応におけるCOX-2のmRNAレベルの上昇を抑制する可能性が類推された。

LPSで刺激したマクロファージにおいては, PGE₂産生量の増加と比例してCOX-2蛋白質発現の増大が認められる。本実験では, 数種のフラボノイドにお

いてCOX-2蛋白量がコントロールに比べ減少しており、PGE₂産生量の減少が、COX-2蛋白質発現のレベルと相関することが明らかになった。

また、COX-2の誘導を阻害することによりアレルギー性炎症反応を抑制できることは良く知られている¹⁰⁾。これらの知見はアレルギーにおける抗原抗体反応によって起こる炎症の繰り返しにおいて、誘導されたCOX-2が重要な働きをすることを示唆している。本試験において、PGE₂産生抑制を強く抑制したapigeninやgenisteinなどのフラボノイドはCOX-1蛋白質発現に影響を与えることなく、COX-2蛋白質の発現を抑制しており、これらのフラボノイドのPGE₂産生抑制機序はCOX-2蛋白質の発現抑制であることが示唆された。

LPS刺激したラット炎症性腹腔マクロファージにおいて、フラボノイドはCOX-2由来のPGE₂産生を抑制するが、COX-1由来のPGE₂産生はほとんど抑制しておらず、COX-2の選択的阻害剤であるNS-398と同じ効果を示した。NS-398処理によりPGE₂産生は強く抑制され、そのIC₅₀は0.1μM以下であった。非ステロイド抗炎症薬であるアスピリンはCOX-1とCOX-2の両者を不可逆的に不活化することにより、PGE₂産生を抑制する。いくつかのフラボノイドではアスピリンとほぼ匹敵するIC₅₀を示したが、その作用機序は酵素の不可逆的不活化とは異なると考えられた。

また、用量反応曲線およびWestern blot法を用いてCOX-2蛋白質の発現を調べた結果では、40μMのapigenin（フラボン）はPGE₂産生を強く阻害するだけでなく、COX-2蛋白質の発現も抑制した。それに対し、40μMの7-hydroxyflavonol（フラボノール）やeriodictyol（フラバノン）は、PGE₂産生を阻害するが、COX-2蛋白質の発現抑制は弱かった。このことから、フラボンのPGE₂産生抑制作用機序はCOX-2蛋白質の発現抑制であるが、フラボノールやフラバノンの作用機序は、Kalkbrennerらの報告⁴⁾と同様に、PGE合成酵素やホスホリパーゼA₂活性の阻害等に由来する可能性があると考えられた。

また、今回の検討に用いたような*in vitro*試験ではフラボノイドの細胞膜透過性も活性発現に大きな影響を与えると考えられる。いくつかのフラボノイドでは、配糖体はそれに対応するアグリコンに比較し、効果が小さい。例えば、quercetinはPGE₂産生抑制活性がIC₅₀で13.9μMであるのに対し、その配糖体であるrutinやquercitrinは1000μM以上で、ほとんど活性は認められなかった。さらに、genisteinやdaidzeinに対するgenistinおよびdaidzinについても同様の傾向が認められた。配糖体とアグリコンについてのこのような抑制活性の違いには、細胞膜透過性が寄与しているものと考えられた¹¹⁾。フラボノイドの細胞膜透過性は、フラボノイドの疎水性の強さに大きく影響されており、疎水性の強さは水酸基の数および糖の配位等によって左右される。このことが、B環に3以上の水酸基を有するフラボノイドにPGE₂産生抑制効果が認められなかった理由の一つと考えられた。

さらに、近年では*in vivo*におけるフラボノイドの代謝についての研究も進んでいる。植物や食品に含有されるフラボノイドは、フラバン-3-オール (catechin等)を除き、配糖体 (rhamnoside, glucoside, hesperidoside等) の形で存在することが多く、本実験のような*in vitro*試験では、フラボノイド配糖体はPGE₂産生抑制活性を示さないことから、生体内で作用しにくいとも考えられる。これに対し、*in vivo*で経口投与されたフラボノイドは、量的には非常に少ないが、加水分解されたアグリコンの形で吸収されると考えられている。さらに、Erlundらのquercetinとrutin (quercetin-3-O-rutinoside) に関する薬学的な知見によれば、quercetinとrutinを経口投与した場合、quercetinのグルクロン酸抱合体もしくは硫酸抱合体のみが血中に認められ、rutinは検出されていないことから、体内においてフラボノイドはアグリコンの抱合体として存在することが示唆されている¹²⁾。しかし、炎症局所においてはβ-glucuronidase活性の亢進に伴い、フラボノイド抱合体がアグリコンに脱抱合されることが確認されており¹³⁾、また、血清中のquercetinとその抱合体 (B環もしくは3位に抱合) は、大腸がん細胞に対し、無刺激状態およびinterleukin-1βにより誘導された状態のいずれにおいてもCOX-2のmRNA発現量を低下させることが報告されている¹⁴⁾。以上のような知見から、フラボノイドの経口摂取による吸収量は低値であると推察されるが、血液中に確認される量でも十分な抗炎症活性を示すと考えられる。

2) - 3 フラボノイドの白血球接着分子抑制活性と作用機序

フラボノイドのサブクラスのうち、フラボン、フラボノール、フラバノン、イソフラボンおよびchalconeに属する数種のフラボノイドが、TNF-α刺激による白血球接着分子E-selectin発現を抑制することが認められた。本結果をフラボノイドの構造と比較して考えた場合、フラボノイドA環に存在するC2-C3の2重結合を持つグループの方が単結合のグループよりも強い活性を示した。さらに、4位のケトン基は、本抑制活性の発現に必須であると考えられた。

また、AおよびC環においては、3位に水酸基を有するフラボノールは同じ構造で水酸基を持たないフラボンよりもやや活性が劣り、フラバン3-オールは活性を示さなかった。さらに、6位の水酸基を有するものは活性を持たないことから、本活性の発現に水酸基の数や位置が重要な役割を示していることが明らかになった。また、B環の水酸基では、4'位単独、もしくは3',4'位のジヒドロキシ構造を取る場合には活性を示すが、全く水酸基を持たないか、メトキシ基である場合には抑制活性が認められなかった。

構造活性相関の点では前項で検討したPGE₂の産生抑制に類似するところも見受けられるが、イソフラボンやフラバノンの抑制活性が低いことなどから、PGE₂産生抑制とは異なる作用機序により白血球接着分子発現抑制活性を示している可能性も示唆された。

近年、ChoiらはフラボノイドとICAM (intracellular cell adhesion molecule)-1, VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1およびE-selectin等の細胞接着分子発現との関係について調べ、luteolinやapigenin, quercetinは細胞接着分子の転写抑制により、単球の接着を阻害すると報告しているが¹⁵⁾、本試験でもほぼ同様の結果が得られており、それ以外の発現抑制が認められたフラボノイドの作用機序も同じく転写抑制であると考えられた。

フラボノイド配糖体とそれに対応するアグリコンを比較すると、配糖体では阻害活性が認められなかった。これは、前章に述べたのと同様に、配糖体とアグリコンの細胞膜透過性の違いに起因しているものと考えられた。

5. ICRマウスを用いたフラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果の検討

前項までに述べたように、一部のフラボノイドに炎症抑制効果が認められたことから、動物モデルを用い、実際にアレルギー性炎症を惹起した際にフラボノイドがどのような効果を示すかを検討した。

フラボノイドの炎症抑制活性に関する研究では、前述のように細胞レベルでの報告は多いが、動物への投与による活性を検討した報告はあまり多くない。本試験では、卵白アルブミン (OVA) を抗原としてFIA (フロイント不完全アジュバント) とのエマルジョンをICRマウスの腹腔内に投与することにより感作を行い、同時に皮下へフラボノイドを投与した。感作成立 (開始2週間) 後、背部皮内に抗原を接種することにより即時型アレルギー反応を惹起し、遊離したヒスタミンによる血管透過性の亢進に対するフラボノイド投与の影響を明らかにすることを目的とした。

その結果、血漿成分の滲出量を炎症強度の指標として測定したところ、図6に示したように、供試したapigenin, eriodictyolのいずれも、0.5 μ MのOVA投与を行った部位で、コントロールに比較して有意に血漿成分の滲出量が抑制され、フラボノイドの炎症抑制効果が動物レベルで確認された。一方、血清中のIgG₁, IgE抗体量およびOVA特異的IgG₁抗体価については差が認められず、炎症抑制作用機序についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

この結果から、フラボノイドの投与により動物モデルを用いた即時型アレルギーによる炎症を抑制できる可能性が期待され、炎症抑制効果を示す物質の探索に際し、細胞レベルでのPGE₂産生抑制活性やE-selectin発現抑制活性などを指標として用いることができると考えられた。しかし、実際の即時型アレルギー反応による血管透過性亢進を抑制する作用機序についてはまだ不明な点が多く残されており、今後さらなる研究が必要である。

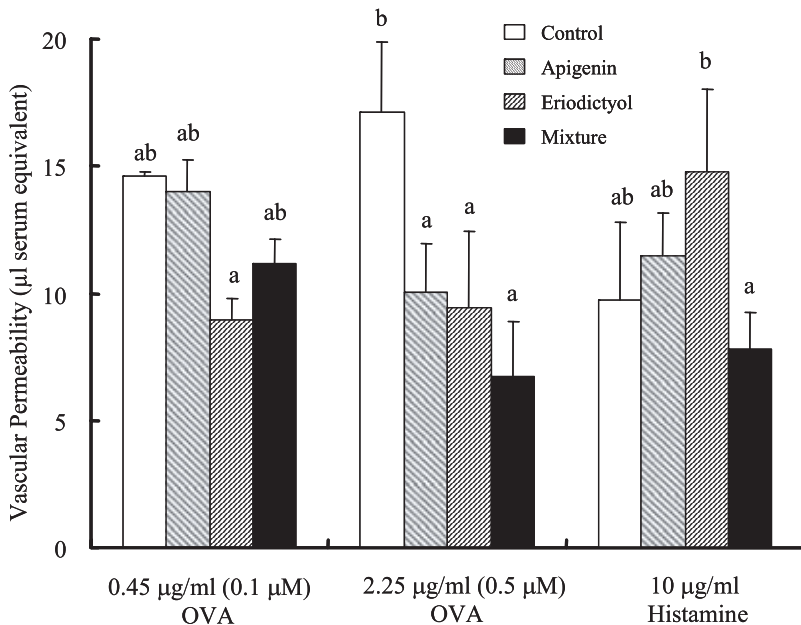


図6 Plasma leakage by injections of OVA and histamine in ICR mice.

FITC BSA were injected to OVA sensitized ICR mice from a tail vein under light ether anesthesia. The animals were injected with OVA (antigen) and histamine solution into the dorsal skin. After 30 min, the mice were sacrificed by cardiac puncture.

The plasma leakage of the injected sites of skin were measured as the rate of fluorescence intensity of the skin and 50 µl of serum. Values were expressed as mean ± standard error (n = 6). Zero on the x-axis refers to skin sites injected with Tyrode's solution only.

The values sharing unlike letter differ significantly (p < 0.05).

5. おわりに

以上のように、炎症に関わるケミカルメディエータ産生および白血球浸潤を指標として、フラボノイドの炎症抑制効果についてその構造活性相関や作用機序について検討を行なった。その中で、いくつかのフラボノイドに抗炎症活性が確認されたことから、アレルギー動物モデルを用い、即時型アレルギー反応における血管透過性亢進に対するフラボノイドの効果を検討した。その結果、実際にアレルギー性炎症の抑制にフラボノイドが有効であることが確認された。

アレルギー性炎症疾患罹患患者の増加に伴い、その症状を和らげることのできる、

いわゆる「抗アレルギー食品」の需要は今後さらに増加し、機能性食品の中でも大きな位置を占めるようになって考えられる。そこで、このような需要の増大や機能性食品への期待に対し、どのように対応していくかがこれからの大きな課題である。

そこで、現在行っている細胞や動物を用いるスクリーニングを一步進め、ヒトでの効果が期待できるような新たなスクリーニング手法の開発を行う。ヒトへの外挿が可能なスクリーニング手法を用いてアレルギー抑制成分の探索を行なうことにより、アレルギー患者の生活の質を向上させる食品開発を目標に研究を遂行していく。

(食品機能部 機能成分研究室 石川 祐子)

引用文献

- 1) Makino T, Furuta A, Fujii H, Nakagawa T, Wakushima H, Saito K, Kano Y. (2001) Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biol Pharm Bull.* 24: 1206-1209.
- 2) Landolfi R, Mower RL, Steiner M (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1525-1530.
- 3) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 686-691.
- 4) Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F (1992) *In vitro* inhibition and simulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship. *Pharmacol.* 44: 1-12.
- 5) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 21: 959-963.
- 6) Shrh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phyto-chemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* 480-481: 243-268.
- 7) Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals

and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47: 357-362.

- 8) Palmieri L, Mameli M, Ronca G (1999) Effect of resveratrol and some other natural compounds on tyrosine kinase activity and on cytoskeleton. *Drugs Exp. Clin. Res.* XXV: 79-85.
- 9) Chi YS, Cheon BS, Kim HP (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1195-1203.
- 10) Oguma T, Asano K, Shiomi T, Fukunaga K, Suzuki Y, Nakamura M, Matsubara H, Sheldon HK, Haley KJ, Lilly CM, Drazen JM, Yamaguchi K (2002) Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 382-386.
- 11) Walgren RA, Walle UK, Walle T (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1721-1727.
- 12) Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics and disposition: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56: 545-553.
- 13) Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinoshita N (2001) Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.* 29: 1521-1524.
- 14) O'Leary KA, Pascual-Teresa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* 551: 245-254.
- 15) Choi JS, Choi YJ, Park SH, Lee YJ, Kang YH (2002) Selection of flavonoids inhibiting expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor- α in human vascular endothelial cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 1134-1141.